

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1902-1903 — N° 73

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine

DE LA RECHERCHE
DU
BACILLE D'EBERTH
DANS LES EAUX DE BOISSONS

Étude critique de quelques procédés récents

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 20 Décembre 1902

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Raymond GÉZES

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE DE LYON

Né à Aire-sur-Adour (Landes), le 7 novembre 1878



LYON

Imprimerie WALTENER & C^{ie}, Successeurs de Mougin-Rusand
3, Rue Stella, 3

1902

DE LA RECHERCHE
DU
BACILLE D'EBERTH
DANS LES EAUX DE BOISSONS

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1902-1903 — N° 73

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine

DE LA RECHERCHE
DU
BACILLE D'EBERTH

DANS LES EAUX DE BOISSONS

Étude critique de quelques procédés récents

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 20 Décembre 1902

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Raymond GÈZES

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE DE LYON

Né à Aire-sur-Adour (Landes), le 7 novembre 1878

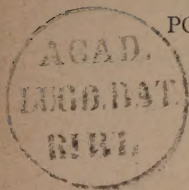


LYON

Imprimerie WALTENER & C^{ie}, Successeurs de Mougins-Rusand

3, Rue Stella, 3

1902



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. LORTET.	DOYEN.
LACASSAGNE	ASSESEUR.
CROLAS.	QUESTEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PAULET, CHAUVÉAU

PROFESSEURS

Cliniques médicales	{ MM. LÉPINE.
	BONDET.
	BARD.
Cliniques chirurgicales	{ PONCET.
	JABOULAY.
Clinique obstétricale et Accouchements	FOCHIER.
Clinique ophtalmologique.	GAYET.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GAILLETON.
Clinique des maladies mentales	PIERRET.
Clinique des maladies des enfants	WEILL.
Physique médicale	MONOYER.
Chimie médicale et pharmaceutique	HUGOUNENQ.
Chimie organique et Toxicologie.	CAZENEUVE.
Matière médicale et Botanique.	FLORENCE.
Parasitologie	LORTET.
Anatomie	TESTUT.
Anatomie générale et Histologie	RENAUT.
Physiologie	MORAT.
Pathologie interne	TEISSIER.
Pathologie externe	AUGAGNEUR.
Pathologie et Thérapeutique générales.	MAYET.
Anatomie pathologique	TRIPPIER.
Médecine opératoire.	POLLOSSON (M.)
Médecine expérimentale et comparée	ARLOING.
Médecine légale	LACASSAGNE.
Hygiène	COURMONT (J.).
Thérapeutique	SOULIER.
Pharmacologie	CROLAS.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Clinique des maladies des femmes	MM. POLLOSSON (A.), agrégé
Maladie des voies urinaires.	CHANDELUX, —
Maladies des oreilles, du nez et du larynx	LANNOIS, —
Propédeutique médicale	ROQUE, —
Propédeutique chirurgicale	ROLLET, —
Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN, —
Anatomie pathologique	DEVIC, —
Physiologie	DOYON, —
Accouchements.	FABRE, —
Botanique.	BEAUVISAGE, —

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
ROUX.	SIRAUD.	BÉRARD.	VILLARD.
COLLET.	DURAND.	SAMBUC.	TIXIER.
BOYER.	PIC.	BORDIER.	FABRE.
BARRAL.	FAVIOT.	COURMONT (P.).	REGAUD.
MOREAU.	NOVÉ-JOSSERAND	CHATIN.	CAUSSE, ch...
VALLAS			

M. BEAUDUN, Secrétaire

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. MARLOING, Président; M. ROUX, Assesseur;
MM. PIC et COURMONT (P.), Agrégés.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE ET A MA SŒUR

Je dédie ce modeste travail,
comme preuve de mon affection et
de ma reconnaissance.

A MES PARENTS

A MONSIEUR LE DOCTEUR H. NOGARO

A MONSIEUR LE DOCTEUR E. MOSSEL

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. COURMONT

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine
Médecin des Hôpitaux
Officier de l'Instruction Publique

A MES MAITRES

DE L'ÉCOLE DE SANTÉ MILITAIRE

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR S. ARLOING

Professeur de Médecine Expérimentale et Comparée

Directeur de l'École Vétérinaire

Directeur de l'Institut Antirabique de Lyon

Directeur Inspecteur de l'Institut antituberculeux d'Hauteville

Membre correspondant de l'Institut

Officier de la Légion d'Honneur

Officier de l'Instruction Publique

AVANT-PROPOS

L'idée première de ce travail revient tout entière à notre savant Maître, Monsieur le Professeur J. Courmont, qui nous ouvrit en même temps les portes de son laboratoire, où, sous sa haute direction, nous avons travaillé pendant près d'une année aux recherches qui font le sujet de cette thèse.

Nous ne pensons nullement avoir fait une étude complète de la biologie comparée du Bacille d'Eberth-Gaffky et du Bacille d'Escherich. Le champ d'expérience, déjà bien défriché cependant, eut encore été trop vaste pour nos faibles forces. Nous nous sommes seulement borné à envisager la valeur comparative et absolue de quelques méthodes de diagnostic différentiel, trop heureux encore, si les quelques heures que nous y avons employées nous permettent d'obtenir un résultat appréciable.

Notre travail se divisera en six parties bien distinctes.

Nous ferons d'abord, dans un court historique, l'ex-

posé de la question. Nous ferons alors, en quatre parties, l'étude de certaines des plus récentes méthodes de diagnostic différentiel. Puis viendront en dernier lieu, comme applications pratiques, quelques analyses d'eaux que nous avons eu la facilité de faire dans le courant de nos expériences.

Pour toutes nos expériences, nous nous sommes servi d'au moins six échantillons de bacille typhique et six échantillons de colibacille. En voici d'ailleurs la provenance :

- Eberth* Lab..... bacille de laboratoire,
- *We*..... du sang de dothiésentérique,
- *For*..... id.,
- *Mou*..... d'abcès post-typhique du grand
droit,
- *Bou*..... du sang de dothiésentérique,
- *Toq*..... id.,
- Coli* *R*..... bacille de laboratoire,
- *R*²..... id.,
- *N*..... d'abcès du rein,
- *Cl*..... matières fécales humaines nor-
males,
- *Chien* ... matières fécales de chien,
- *Mou*..... de putréfaction animale.

Pour certaines méthodes seulement (nous regrettons que le peu de temps dont nous avons disposé nous ait empêché de le faire pour toutes), nous avons expérimenté la manière dont elles se conduiraient

vis-à-vis d'espèces microbiennes autres que *Bacillus Coli Communis* et *Bacillus typhosus*. Nous les avons alors mises en présence de quelques microorganismes, aquatiques normalement ou seulement par hasard, tels que :

Staphylococcus pyogenes aureus,
Staphylococcus pyogenes albus,
Streptococcus pyogenes,
Bacillus prodigiosus,
Bacillus subtilis,
Bacillus mesentericus vulgaris,
Vibrio cholerae,
B. vert de l'eau,

.....

et quelques mélanges provenant de suppurations à *B. Coli*, *Streptocoques* et *Staphylocoques*.

Il nous reste à remercier tous ceux qui se sont intéressés à nos efforts, et nous ont aidé de leur savoir et de leur expérience. Monsieur le Professeur J. Courmont nous accueillit avec bienveillance dans son laboratoire : nous conserverons un souvenir ému de sa bonté et de son affabilité. Monsieur le Docteur Ch. Lesieur a droit à toute notre reconnaissance : le concours de ce jeune maître nous a permis de poursuivre jusqu'au bout la tâche entreprise. A MM. les Docteurs Jullien, Montagard, Lacomme, du laboratoire d'hygiène, l'expression de notre cordiale sympathie.

Monsieur le Professeur Arloing nous fait le très grand honneur de vouloir bien présider la soutenance de notre thèse : qu'il veuille croire à notre très sincère et très respectueuse gratitude.

Nous voudrions aussi remercier autant qu'il nous est permis de le faire, MM. les Professeurs Agrégés G. Roux, A. Pic et P. Courmont, de leur constante obligeance à notre égard.

R. G.

HISTORIQUE

En 1880, *Eberth* (1) signalait la présence d'un bacille, dans la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer des dothiésentériques. La constance et la fixité des caractères de ce bacille le firent songer à sa spécificité, et il émit l'opinion que ce bâtonnet de 2 à 5 μ . de long sur 0,4 μ . de large, était l'agent pathogène de la fièvre typhoïde. Il n'apportait d'ailleurs aucune preuve définitive à l'appui de son assertion. Mais, cette découverte fut confirmée peu après par d'autres observateurs, au premier rang desquels il faut citer *R. Koch* (2) qui obtint, en 1881, des préparations microscopiques de foie et de rate de dothiésentériques, où l'on voyait les amas bacillaires signalés par Eberth.

La connaissance complète du bacille typhique n'est due cependant qu'à *Gaffky* (4), qui, en 1884, eut le

N. B. — Les chiffres en caractères *gras* renvoient à l'Index bibliographique; les autres chiffres renvoient aux notes du bas de la page.

mérite d'isoler ce bacille, d'en avoir des cultures pures, et de préciser la marche à suivre pour le retrouver.

Un an après, environ, *Escherich* (5) isolait des selles des nourrissons, et décrivait un bacille qui depuis a été trouvé l'hôte constant de l'intestin de l'homme et des animaux. Ce bacille se présentait sous la forme de bâtonnets longs de 2 à 4 μ , larges d'environ 0,4 μ ; mobile, souvent avec une apparence diplobacillaire, il ressemblait assez au bacille d'Eberth, mais avait la propriété de donner sur pomme de terre des cultures très typiques. A cette époque, en conséquence, on faisait le diagnostic différentiel des deux bacilles, Bacille d'Eberth-Gaffky et Bacille d'Escherich, par ce caractère considéré comme très important.

Ensemencés sur pomme de terre, les deux microbes donnaient des cultures d'aspect très différent. Le bacille d'Eberth, même après deux jours d'étuve n'y produisait pas de colonies nettement appréciables, et, quand elles devenaient visibles, elles présentaient l'aspect dit depuis « *en have d'escargot* ». Tout au contraire du bacille d'Eberth, le colibacille se développait très rapidement sur ce même milieu, et, au bout de vingt-quatre heures d'étuve, à peine, il y avait déjà pullulé en colonies très épaisses, visqueuses et luisantes, aspect comparé depuis à celui de la « *purée de pois* ».

On par faisait encore le diagnostic différentiel de ces deux bacilles au moyen de l'observation macroscopique des cultures sur gélatine, en plaques ou en piqûres : l'aspect en « *montagne de glace* » des colonies typhiques était jugé spécifique et les grosses colonies

opaques et jaunes appartenaient seulement au bacillus coli communis.

C'est aidés de l'observation microscopique, avec ces deux seuls caractères biologiques de l'aspect des cultures sur pomme de terre et sur gélatine, que les hygiénistes, hydrologues et microbiologistes, cherchaient le bacille typhique dans les eaux de boisson. *Brouardel* rapporte de nombreuses analyses d'eaux où il conclut à la présence de bactéries typhogènes ou non, d'après ces seuls caractères, à tel point, que même après 1891, un des plus distingués médecins et bactériologues de notre pays pouvait écrire : « *Quel est le microbiologiste compétent qui voudrait confondre l'un avec l'autre ces deux microorganismes, si différents sous tous les rapports :... le bacille d'Eberth et le bacille d'Escherich ?* » (1).

Mais, de cette façon, on se trouvait souvent en face d'eaux ayant donné la fièvre typhoïde et où on ne décelait pas le bacille d'Eberth, et infiniment plus souvent encore, en face d'échantillons d'eaux paraissant contenir le bacille typhique et qui n'avaient jamais provoqué d'épidémie de dothiéntérie. Toutes ou presque toutes les analyses microbiologiques d'eaux de boisson mettaient alors en évidence le bacille typhique, et on était sous la menace perpétuelle d'invasions de la fièvre typhoïde : le bacille d'Eberth-Gaffky était partout.

Tout à coup, en 1889, MM. *Rodet* et *Gabriel Roux*

(1) v. in *Traité de Path. générale* de Bouchard, 1896, t. II, p. 543.

(24), de Lyon, découvrent des ressemblances frappantes entre le bacille typhique et le colibacille. A trois reprises différentes, ces auteurs proclament l'identité, ou plutôt la communauté d'origine des bacilles typhique et coli, en mettant sur le compte des conditions de milieu ou de vitalité, la production de l'une ou l'autre de ces formes. « Les nouvelles constatations, aussi nombreuses qu'intéressantes, touchant la morphologie et la biologie du bacille d'Eberth et du bacille d'Escherich, ne font que nous raffermir davantage dans l'opinion que ces deux microorganismes constituent, non deux *espèces*, mais deux *variétés* ou *races* différentes, et que la forme *coli*, joue, *telle quelle*, un rôle important dans la genèse et la pathogénie de la fièvre typhoïde, rôle dont la détermination n'est pas encore définitive. »

A la suite des affirmations des auteurs lyonnais, toute une série de travaux sont venus compléter la connaissance que l'on avait de la morphologie et de la biologie de ces deux bacilles. On assista alors à l'éclosion d'un mouvement scientifique inouï, qui, dans tous les pays, passionna et passionne encore médecins et bactériologues. Les savants les plus compétents et les plus dignes de foi, ont soulevé chacun un coin du voile qui recouvrait l'histoire de ces deux microorganismes : Wurtz, Chantemesse et Widal, Elsner, Dubief, Macé, Grimbert, Nicolle, Arloing, Perdrix... N'eût-elle eu que le mérite de susciter un pareil nombre de travaux intéressants, la théorie de MM. Rodet et G. Roux aurait sa place marquée dans la science. Mais on leur est redevable d'autre chose : à ce moment

et par eux, la *Colibacillose* a été créée de toutes pièces: le *Colibacille* s'est élevé du rang de *saprophyte* vulgaire à celui de bactérie *pathogène*.

On ne doit cependant pas se rattacher sans réserve à l'opinion qu'émettaient ces auteurs sur les rapports du bacille typhique et du bacille coli entre eux et avec la fièvre typhoïde. Il existe entre ces types de bactéries certaines différences importantes au point de vue de leurs propriétés et de leur manière d'agir dans l'organisme. La réaction agglutinante du sérum-Eberth vis-à-vis du bacille typhique et seulement vis-à-vis de lui, ainsi que le défaut d'agglutination du bacille d'Eberth par le sérum-coli sont deux faits d'ordre assez capital pour établir une ligne de démarcation nette entre ces deux bacilles. On doit cependant reconnaître que ce sont deux espèces très voisines, issues peut-être d'une même source originelle, saprophytique certainement, mais adaptés différemment de façon à constituer deux types distincts, pathologiquement surtout, sans qu'on puisse penser à leur transformation possible de l'une dans l'autre actuellement.

Une conséquence toute naturelle fut la suite de ces discussions et de ces travaux. On révoqua en doute les résultats des analyses d'eaux qui avaient été faites jusqu'alors, car toute une série de *paracolibacilles*, de *similtifi*,.... et autres variétés, avaient dû très certainement être enregistrés comme bacilles d'Eberth, alors que rien n'était moins certain. Et on alla même beaucoup plus loin. Les noms de *Nicolle*, *Malvoz*, *Schneider*, *Cassédebat*, *Roux* et *Rodet* eux-mêmes sont intimément liés à cette période de l'évolution de l'ana-

lyse bactériologique des eaux potables. On affirme alors que le Bacille d'Eberth se rencontre très rarement dans les eaux typhogènes. *Schneider* rapporte que sur 187 échantillons d'eaux suspectes, analysés avec le plus grand soin au Val-de-Grâce, le bacille d'Eberth n'a été trouvé que *sept* fois; *Cassedebat* (29) rapporte également ne l'avoir *jamais* rencontré sur 70 échantillons d'eau de Marseilleensemencés largement..... Et plusieurs raisons sont données pour cela. Le bacille d'Eberth, dit-on, ne vit pas longtemps dans l'eau (3 à 5 jours: *Karlinski*) (22)..... A tel point que MM. *Rodet* et *G. Roux* (115-116) pouvaient dire encore en 1896: « A l'heure actuelle, les bactériologues
« sont à peu près unanimes à reconnaître qu'il est
« *absolument impossible* de déceler par les procédés
« connus et usuels la présence du *Bacille d'Eberth* dans
« des milieux (eau, matières fécales, pus, etc...) où
« coexiste le *bacille d'Escherisch*. »

Actuellement, après avoir passé par ces alternatives de faveur et de défaveur, de succès et d'insuccès, la recherche bactérioscopique du bacille d'Eberth dans les eaux de boisson prend un regain de vigueur. Les analyses, plus fréquentes et surtout plus minutieuses, deviennent plus dignes de créance. Et cette valeur qui leur manquait, il n'y a guère encore que quelques années, leur vient justement des nombreux travaux nés de cette longue discussion à propos de l'identité du Bacille typhique et du *Bacillus Coli Communis*. Les caractères spéciaux de ces deux espèces sont sortis du débat avec leur véritable valeur, châtiés pour ainsi dire : bien plus, nombre d'entre eux ne doivent d'être

connus qu'à l'existence même de ce différend scientifique.

On s'est alors trouvé en présence de plusieurs sortes de difficultés pratiques.

Puisque, dans l'eau, l'association colibacillaire tend à faire disparaître le bacille d'Eberth sous un véritable écrasement dû à la pullulation rapide du colibacille lui-même, sans compter les autres microbes aquatiques ordinaires, il fallait absolument supprimer cette pullulation fâcheuse, et, d'autre part, s'assurer de prélever les bacilles typhiques peu ou pas nombreux, perdus dans des masses d'eau quelquefois considérables : il s'agissait donc en premier lieu, de concentrer la teneur de l'eau en microbes, de réunir tous les microbes disséminés dans un grand volume, plusieurs litres par exemple, et de les parquer en quelque sorte dans quelques centimètres cubes seulement.

Puis il fallait aussi supprimer autant que possible l'action gênante des nombreuses bactéries ordinaires de l'eau, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Cladothrix*, *Streptothrix*, *Beggiatoa*, *Crenothrix*, etc., etc., pour ne citer que les genres principaux qui constituent le groupe botanique des *Bactériacées*. Il fallait trouver, par des artifices de laboratoire, un milieu où pussent coloniser presque exclusivement les deux espèces bacillaires en question, sans avoir à craindre leur étouffement par de vulgaires saprophytes : et, si possible, trouver un milieu où pût pousser le bacille d'Eberth, à l'exclusion du bacille *Coli* commun. Il fallait tenter l'isolement successif ou d'emblée du bacille d'Eberth, puis, une fois isolé, repérer ses

caractères morphologiques et biologiques pour être enfin en mesure de condamner ou non l'usage d'une eau de boisson, et d'en affirmer ou non la nocivité.

C'est à cette quadruple recherche que se sont attaqués de nombreux expérimentateurs. Beaucoup ont ainsi facilité la tâche dans l'expertise bactériologique des eaux potables, et tous ont proposé des modifications à la technique ancienne :

- 1° Pour concentrer la teneur en microbes de l'eau à analyser ;
- 2° Pour séparer concurremment le bacille typhique et le colibacille des autres espèces de la flore bactérienne des eaux ;
- 3° Pour isoler dans les cultures mixtes le bacille d'Eberth du colibacille ; et enfin,
- 4° Pour distinguer différenciellement le bacille d'Eberth-Gaffky du bacille d'Escherich.

C'est dans cet ordre que nous allons examiner la valeur de quelques procédés récents ; nous donnerons pour chaque méthode la technique préconisée, les résultats obtenus et l'appréciation que nous feront porter nos recherches personnelles.

PREMIÈRE PARTIE

Procédés de Concentration des Microbes

CHAPITRE PREMIER

Filtration sur bougie poreuse

Rien n'est plus naturel que de recourir aux bougies poreuses filtrantes pour recueillir sous un volume réduit tous les microbes qui sont disséminés à des taux parfois minimes dans de grandes quantités d'eau à analyser.

A. — PROCÉDÉ DE LOIR (15)

La première mention d'un ensemencement d'eau potable, préalablement concentrée au point de vue microbien par filtration sur bougie Chamberland, est consignée dans les *Annales de l'Institut Pasteur* sous la signature de A. Loir.

A la suite d'un avis annonçant pour une période de vingt jours la distribution d'eau de Seine aux habitants

du Ve arrondissement, Loir ajusta à sa prise d'eau un filtre Chamberland à 5 bougies, capable de donner en vingt-quatre heures, 13 litres d'eau filtrée. Le filtre resta en place du 3 au 23 août 1887 et laissa ainsi passer une moyenne d'à peu près 260 litres d'eau. Cette eau était absolument pure; tous les ensemencements furent négatifs. Mais Loir pratiqua l'ensemencement de l'eau résiduale. Cette eau était trouble et jaunâtre. Répartie en plaques de gélatine phéniquée, elle donna en 2 ou 3 jours des colonies qui furent reconnues pour des colonies de B. d Eberth.

B. — PROCÉDÉ DE CHANTEMESSE

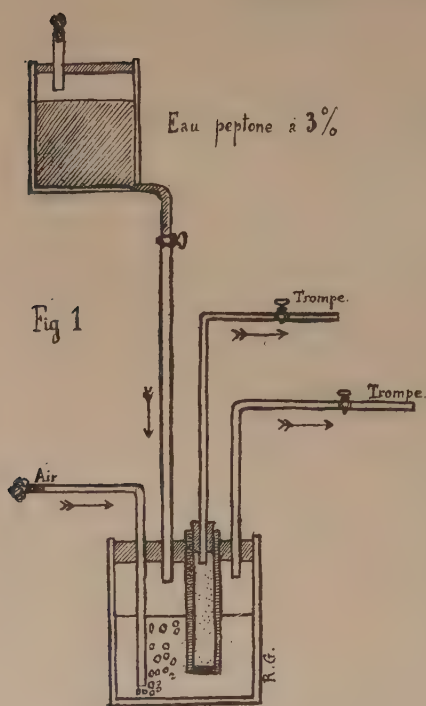


Fig. 1. — APPAREIL DE CHANTEMESSE (Schéma)

Le 5 juin 1901, le professeur *Chantemesse* (191) faisait connaître un procédé de concentration des microbes des eaux, fondé également sur les propriétés des bougies filtrantes, et dont voici la technique :

L'examen de l'eau à analyser porte sur 6 litres. Dans un récipient qui renferme cette eau, une bougie Chamberland stérilisée et dans laquelle on fait le vide, arrête

sur sa surface externe tous les microbes. On lave cette bougie avec 200 grammes d'eau stérile contenant 3 % de peptone (Defresne). On obtient ainsi un liquide trouble que l'on place à l'étuve à 37° dans un petit bocal à large goulot. L'orifice du bocal est fermé par un bouchon percé de 4 trous. Dans le premier trou pénètre une petite bougie poreuse filtrante ; dans le second, un tube de verre muni en haut d'un bouchon d'ouate et par lequel descend au fond du liquide de l'air qui vient y barbotter constamment ; dans le troisième s'engage un tube de verre destiné à faire le vide ; le quatrième enfin reçoit un tube de verre, mis par sa partie supérieure en communication avec un vase rempli d'eau peptone stérile à 3 %.

Quand l'appareil est en marche, à l'aide de tuyaux d'aspiration actionnés par une trompe à eau, on fait le vide dans le flacon pour y aspirer et y faire barbotter l'air, et ensuite on soutire par aspiration à travers la bougie le liquide qui a servi à la culture et qui entraîne avec lui les produits solubles des sécrétions microbiennes. Les germes étant retenus dans le vase et sur les parois de la bougie, on fait pénétrer par un des tubes de l'eau peptone stérile.

La culture et le barbotage de l'air recommencent alors dans un bouillon frais. Le liquide utilisé doit être renouvelé toutes les douze heures, une ou deux fois. Au bout de ce temps, le bocal renferme une culture extrêmement riche en microbes, qu'il s'agira d'identifier.

C. — PROCÉDÉ DE M. F. BORDAS

Toujours pour remédier à l'inconvénient de ne pouvoir, d'après les méthodes employées jusque là, faire porter l'analyse microbienne qualitative que sur de très faibles quantités d'eau, le Dr F. Bordas (188), a introduit dans la pratique de ces analyses, un procédé

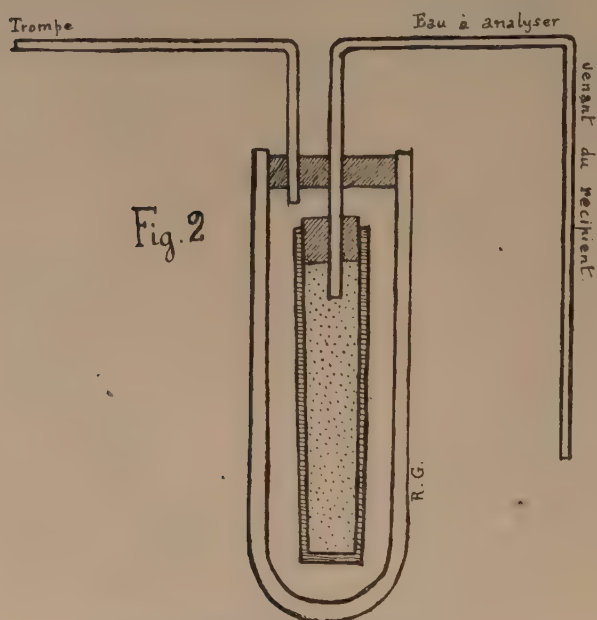


Fig. 2. — APPAREIL DE BORDAS (Schéma).

opérateur de concentration des microbes recherchés.

L'appareil qu'il propose est d'ailleurs simplement fondé sur les propriétés des bougies filtrantes. Il se compose d'une petite bougie filtrante placée dans une gaine en verre d'un diamètre légèrement supérieur à celui de la bougie. Cette gaine est fermée à l'aide d'un

bouchon percé de deux trous qui laissent passer deux tubes de verre ; le tout convenablement luté à la cire ou à la paraffine. Un de ces tubes met la bougie en communication avec un appareil d'aspiration, une trompe par exemple ; l'autre met en communication l'enceinte extérieure avec le liquide à analyser. Le vide étant fait, l'eau, par appel, se précipite dans l'enceinte périphérique, et traversant les parois de la bougie, laisse se déposer sur sa surface extérieure toutes les impuretés qu'elle contient ; on peut ainsi aspirer plusieurs litres de liquide. Une fois l'opération terminée, il suffira de laver cette bougie filtrante avec quelques centimètres cubes d'eau distillée pour avoir ainsi réunis sous un très petit volume, tous les microorganismes qui étaient auparavant dissiminés dans le grand volume d'eau que l'on a ainsi filtré.

D. — PROCÉDÉ DE CAMBIER

Dans ces derniers temps, ce même procédé de concentration a été utilisé par M. R. *Cambier* (190) au cours d'expériences qu'il faisait connaître dans une première note à l'Académie des sciences. Les excellents résultats qu'ont d'ailleurs obtenus ces divers auteurs sont confirmés pleinement par nos observations personnelles, portant sur un certain nombre d'analyses d'eaux de boisson, suspectes d'avoir été l'origine de fièvres typhoïdes.

CHAPITRE II

Pullulation

Lorsqu'on veut avoir une culture d'un microbe quelconque, on met ordinairement en présence du milieu de culture, une parcelle assez petite de la culture mère, mais cela parce que ces cultures mères sont vivaces, abondantes et prolifiques. Mais, comme il arrive souvent que dans un litre d'eau on trouve à peine quelques bacilles d'Eberth, comment être sûr que la goutte ou le centimètre cube d'eau suspecte qu'on mélangera au bouillon de culture, contiendra tous les germes nombreux ou rares qui vivent dans cette eau ? Et, d'un autre côté, puisque le bacille d'Eberth vit difficilement dans l'eau en présence d'autres microbes, tandis qu'il vit très bien en bouillon, que la culture soit contaminée ou non, pourquoi ne pas lui permettre de pulluler tout à son aise ? Ce sont les principes sur lesquels s'appuient deux procédés qui ont de nombreux points de ressemblance. L'eau suspecte sera transformée en un milieu de culture suffisamment nutritif, pour que le bacille d'Eberth et le bacille Coli puissent végéter facilement.

A. — PROCÉDÉ DE PÉRÉ

M. *Péré* conseille, pour arriver à ce but(43), d'introduire dans un ballon d'un litre stérilisé, 100 centicubes de

bouillon de bœuf neutre et stérile : puis 50 centicubes d'une solution de peptone pure à 10 p. 0/0 également neutre et stérilisée, et 600 à 700 centicubes de l'eau à analyser. Ayant ainsi rendu nutritive l'eau à examiner, M. Péré place ce bouillon extemporané à l'étuve à une température de 34 degrés centigrades. (M. Péré recommandait de ne pas dépasser 36°, pour ne pas influencer les microorganismes recherchés. Il est vrai de dire que la pullulation de l'Eberth et du Coli, ainsi que du *Mesentericus vulgatus* à 43°, 44° et 44°5 n'était pas encore scientifiquement constatée).

B. — PROCÉDÉ DE CHANTEMESSE

Onze ans environ après les travaux de M. Péré, le professeur *Chantemesse* (215) reprenant la même idée, reconnaissait les avantages de ce *modus faciendi* et l'érigéait en méthode générale pour retrouver dans les eaux divers microbes pathogènes.

M. Chantemesse procède cependant d'une manière un peu différente :

Prenant un litre d'eau suspecte, préalablement filtrée à travers un papier filtre, pour éliminer d'emblée ce que l'on pourrait nommer les scories de l'eau, il y fait dissoudre 30 grammes de peptone Defresne neutralisée. Puis, il porte cette eau-peptone dans une étuve réglée à 24°, et la laisse ainsi pendant environ une vingtaine d'heures. Il filtre alors le liquide, puis l'additionne de sérum agglutinant correspondant à l'espèce pathogène dont on recherche l'existence,

sérum antityphoïdique, anticholérique, ou antidysentérique, et le laisse reposer pendant deux heures. On décante avec précaution et on jette le liquide en conservant le culot. Ce culot est délayé dans du bouillon stérile, et cette dilution jetée sur des papiers filtres posés à plat les uns sur les autres. Les microbes recherchés, agglutinés en amas par le sérum agglutinant ajouté quelques heures avant, restent pris au-dessus des mailles du papier-filtre, tandis que les bacilles libres sont entraînés par le courant de filtration. C'est cette couche invisible de bacilles agglutinés que l'onensemencera sur différents milieux.

Tels sont les deux procédés, fondés sur la pullulation à l'étuve, qui ont pour but de faire multiplier les germes quelquefois très rares qui peuvent exister dans l'eau et échapper à d'autres méthodes.

Nous avons nous-même opéré comme le recommandent ces deux méthodes. Nous avons traité des eaux suspectes naturellement, par la pullulation à l'étuve et la filtration sur papier. Mais ce mode opératoire réclame d'abord vingt-quatre heures pour arriver à la pullulation demandée, et exige une assez grande quantité de sérum antityphique. Si pour 10 centicubes d'eau, il faut 3 gouttes de sérum, un calcul très simple montre qu'il faut 300 gouttes pour un litre ou plus simplement, à 30 gouttes au centicube, 10 centimètres cubes de sérum. Et de plus, il semble que d'autres microbes puissent être entraînés mécaniquement par l'agglutination. On a bien une concentration de microbes, c'est vrai; mais peut-être y a-t-il trop de microbes. Nous avons eu toutes les fois un dépôt assez

épais, qui nous a donné des colonies très serrées et très nombreuses, partant très difficiles à distinguer et à différencier.

CHAPITRE III

Centrifugation

La centrifugation simple de l'eau, ou mieux de l'eau peptonée où l'on a fait pulluler au préalable les germes microbiens qu'elle contenait et qu'on recherche, a été préconisé surtout par M. *Chantemesse* (191), dans une note parue dans la *Presse Médicale*, du 5 juin 1901.

Nous avons pratiqué un certain nombre d'expériences de contrôle en suivant la technique indiquée. Prenant une goutte de culture vivace de bacille d'Eberth et de bacille Coli, et la diluant dans une assez grande quantité d'eau stérile, environ 100 centicubes, nous avons laissé le mélange et la pullulation se faire pendant environ vingt-quatre heures. Nous avons alors prélevé 20 centicubes de cette eau polluée, et nous l'avons soumise à l'action de la force centrifuge (3.000 tours pendant dix minutes). Puis, nous avons prélevé une petite portion du liquide et du dépôt qui devait s'être formé, d'une part avec une pipette, d'autre part avec une tige de platine recourbée en anse et aplatie en spatule. Et le tout a étéensemencé en bouillon de bœuf peptoné ordinaire.

Nous avons recommencé à plusieurs reprises différentes cette même expérience. Nous avons obtenu quel-

quefois des cultures microbiennes, mais ces cas ont été assez rares ; nous pensons que cette technique est plutôt infidèle, et qu'elle donne souvent des insuccès.

CHAPITRE IV

Centrifugation et précipitation

En 1904, M. le médecin-major *G. Vallet* (208) reconnaissant après les travaux de MM. Péré, Pouchet, Parietti, etc., la nécessité d'opérer sur des quantités assez notables de l'eau à analyser, faisait connaître une nouvelle technique pour la recherche du bacille typhique dans les eaux de boissons.

Après un court exposé, M. Vallet fait découler de la coexistence constante du coli-bacille dans les eaux suspectes, et de la nécessité d'employer de grandes quantités d'eau, deux conclusions :

1° L'importance d'opérer sur une quantité notable d'eau.

2° La nécessité de faire d'emblée l'ensemencement en milieu solide (ceci pour éviter la pullulation facile du coli-bacille dans les bouillons).

De là découlait une difficulté. En effet, pour ensemer en milieu solide une certaine quantité d'eau, 20 centicubes par exemple, il était nécessaire, si on voulait les disperser en plaques de Petri ou autres, de porter le nombre de ces récipients à environ 4 ou 500. Pour obvier à cet inconvénient, M. Vallet propose la centrifugation, et pour la rendre pratique, il propose

l'artifice suivant : un corps pulvérulent en suspension dans l'eau, entraîne en se déposant les microorganismes qui s'y trouvent. C'est là ce que le procédé de M. Vallet contient d'original.

Pour un tube du centrifugeur, contenant 20 cent. cubes d'eau, ajouter 4 gouttes d'une solution saturée et stérilisée d'hyposulfite de soude, puis la même quantité d'une solution (également saturée et stérilisée) d'azotate de plomb. Il se forme immédiatement un précipité qui trouble le liquide. L'appareil est alors mis en mouvement, et au bout de 4 à 6 minutes de rotation (à la vitesse de 3000 tours à la minute), le contenu est redevenu limpide, et un mince dépôt s'est formé au fond. On décante, puis on dissout ce précipité dans un excès (quelques gouttes) d'hyposulfite de soude : ce sera là la solution qui servira aux ensemencements des boîtes de Petri ou autres milieux solides.

Nous avons tenu à employer cette méthode, pour la modification qu'elle apportait à l'emploi de la centrifugation. Dans quatre cas d'analyse d'eau, tandis que la présence du bacille coli nous était dévoilée par d'autres procédés en 48 heures, nous n'avons jamais eu de culture où nous ayons pu mettre en évidence ce même bacille coli.

Une raison sérieuse des insuccès que nous a donnés cette méthode, est la faible quantité d'eau que l'on peut ainsi centrifuger : les centrifugeurs ordinaires, tiennent tout au plus 20 cent. cubes par tube ; les modèles les plus grands ne peuvent centrifuger que 75 centicubes environ. Or, c'est déjà pêcher par le

principe, que d'agir ainsi sur de telles quantités de liquide suspect, et il n'est pas étonnant que l'on ait ainsi assez souvent des mécomptes, en utilisant la méthode de M. Vallet, malgré le perfectionnement incontestable que cet auteur y a apporté.

Nous ne croyons donc pas que la centrifugation combinée à la précipitation puisse avoir le pas sur la culture du résidu de la filtration sur les parois d'une bougie poreuse, et ce sera là, la conclusion de ce premier chapitre.

Le meilleur procédé pour obtenir une concentration suffisante des eaux suspectes, au point d'être certain de ne pas laisser échapper la présence des bactéries pathogènes, entre autres, du bacille d'Eberth, consistera à faire passer à travers une bougie poreuse, une certaine quantité d'eau suspecte (un litre au minimum). On pourra alors recueillir les germes déposés sur ses parois par lavage avec un bouillon stérile ou par râclage avec une aiguille de platine. Lequel de ces procédés est préférable? Nous croyons que le lavage a des avantages sérieux, en ce que mécaniquement il entraîne tous les germes déposés autour de la bougie, tandis que le râclage permet d'en laisser échapper.

Aussi concluerons-nous ce premier chapitre, en constatant que la meilleure technique pour concentrer la teneur microbienne de l'eau, consiste à en pratiquer la filtration sur une bougie poreuse, et à recueillir le dépôt pelliculaire qui recouvre ses parois, en lavant ce dépôt avec du bouillon stérile ordinaire. C'est ce bouillon qui servira aux expériences et aux recherches ultérieures.

DEUXIÈME PARTIE

Procédés d'isolement de l'Eberth et du Coli d'avec les autres microbes des Eaux

Puisque nous avons réussi à réunir, sous un faible volume de semence, les bacilles épars dans une grande masse d'eau, nous allons maintenant essayer d'éliminer les espèces bactériennes vulgaires, saprophytiques ou indifférentes, pour n'avoir en dernier lieu qu'un milieu où se trouvent côte à côte le bacille d'Eberth et le bacille d'Escherich, si, du moins, nous ne pouvons arriver d'emblée à avoir une culture exclusive de bacille typhique.

C'est pour arriver à ce résultat que l'on a proposé différents milieux électifs que nous allons rapidement examiner.

CHAPITRE PREMIER

Milieux solides

Les milieux solides les plus préconisés sont celui de MM. *Chantemesse et Vidal*, et celui de M. *Remy*. Nous laissons de côté pour le moment le milieu électif

d'*Elsner*, nous proposant de nous en occuper dans un chapitre suivant.

A. — MILIEU DE MM. CHANTEMESSE ET WIDAL

MM. *Chantemesse et Vidal* (191), ont proposé il y a quelque temps, l'usage d'une gélose nutritive élective où l'agent de séparation des bacilles typhique et coli d'avec les espèces vulgaires, est l'acide phénique. Voici la manière dont ces auteurs conseillent de préparer ce milieu de différenciation :

Ajouter à 100 grammes d'eau peptone à 3 pour 100, 2 grammes de gélose, et cuire à l'autoclave à 120° pendant trois quarts d'heure, afin de supprimer l'expulsion d'eau qui suit la solidification de la gélose hâtivement préparée. Ce milieu doit être parfaitement neutre et mis à l'abri de la dessiccation.

Quelques minutes avant de l'utiliser, on ajoute 1 gr. 05 d'acide phénique cristallisé pour 1000 de milieu. Il est important que l'addition de l'acide phénique soit récente, car il surviendrait peu à peu une diminution de la quantité de phénol par le fait de sa combinaison avec les matières organiques. On opère ainsi : dans le milieu de culture fondu et maintenu au bain-marie à 46°, on verse : pour 50 gr. de gélose, 2 cent. cubes 01 d'une solution d'acide phénique cristallisé à 1 p. 40 ; et on ensemeince sur ce milieu qu'on dispose en plaques ou mieux en pellicule, suivant le procédé d'Esmarch.

Nous renvoyons le lecteur aux expériences que nous avons faites sur la gélose lactosée, phéniquée et tournesolée du professeur Chantemesse. Les résultats

sont les mêmes, et nous craindrions d'être trop longs ainsi que de nous répéter.

B. — GÉLATINE DIFFÉRENTIELLE DE REMY

Quelque temps après l'apparition de ce procédé, M. *Remy* (181) fit connaître une gélatine différentielle de composition chimique déterminée.

La formule de ce mélange correspond sensiblement à celle de la pomme de terre. Seulement, la dextrine et la glycose y sont supprimées, tandis que le phosphate bisodique a été substitué au phosphate bipotasique. En voici d'ailleurs la composition exacte :

Eau distillée.....	1000 gr.
Asparagine.....	6 gr.
Acide oxalique.....	0 gr. 5
— lactique.....	0 gr. 15
— citrique.....	0 gr. 15
Sulfate de Mg.....	2 gr. 50
Sulfate de K.....	1 gr. 25
Phosphate bisodique..	5 gr.
Chlorure de sodium...	2 gr.

Ces différents sels, le SO^{Mg} excepté, sont broyés dans un mortier, puis introduits dans un matras avec un litre d'eau distillée et 30 grammes de peptone *Witte* (de *Rostock*). On chauffe ensuite à l'autoclave sous pression pendant un quart d'heure. Dès qu'on retire le matras, on en verse le contenu bouillant dans un autre matras, lequel a préalablement reçu 120-

150 grammes de gélatine ; on agite pour dissoudre celle-ci, puis on ajoute de la soude jusqu'à alcalinisation légère.

On cuit à l'autoclave à 110° sous pression pendant un quart d'heure, puis on acidifie avec une solution demi-normale de $\text{SO}^{\circ}\text{H}^2$, de telle sorte que 10 centicubes de gélatine aient une acidité telle que celle-ci disparaît par l'addition de 0,2 centicubes de solution demi-normale de NaOH . Cette acidité équivaut à 0 gr. 5 de $\text{SO}^{\circ}\text{H}^2$ par litre. Après agitation on remet au poêle à vapeur pendant 8-10 minutes, puis on filtre. Quand la filtration est obtenue on vérifie l'acidité. Pour cela, on prélève à l'aide d'une pipette graduée, 10 centicubes de gélatine que l'on dépose dans un vase de Bohême, contenant environ 100 centicubes d'eau distillée exactement neutre, et IV à V gouttes de phtaléine du phénol. On laisse alors tomber goutte à goutte, au moyen d'une pipette de 1 centicube graduée en centièmes, la solution demi-normale de soude. La coloration rouge doit apparaître sitôt que 0,2 centicubes de la solution sodique ont été ajoutés aux 10 centicubes de gélatine. Dès que l'acidité voulue est obtenue, on introduit le $\text{SO}^{\circ}\text{Mg}$ à la dose de 2 gr. 50 par litre de gélatine ; on répartit en tubes, 10 cent. cubes dans chacun, et on stérilise en trois séances comme pour la gélatine ordinaire.

Au moment de l'emploi, on introduit dans chaque tube de gélatine, 1 centicube d'une solution de lactose à 35 p. 100, et 0,1 centicube d'une solution phéniquée à 2 gr. 5 p. 100. Alors, le milieu est prêt, et on s'en sert comme d'une gélatine quelconque.

Une fois un tel milieu préparé, si l'on y ensemence concurremment du bacille d'Eberth et du bacille Coli communis, il sera assez facile, dit M. Remy, de les distinguer et de les reconnaître, au bout de 48 heures à 3 jours de culture. Les colonies sont profondes ou superficielles.

Les colonies profondes du bacille Coli sont arrondies, ovoïdes, parfois fusiformes et d'une coloration brun jaunâtre : de fines bulles de gaz provenant de la décomposition de la lactose les accompagnent quelquefois. Les colonies superficielles, globuleuses ou étalées, sont opaques, épaisses, et colorées également en brun jaunâtre : au début, elles ont quelquefois une transparence bleutée qu'elles perdent d'ailleurs rapidement.

Les colonies typhiques, elles, toujours plus petites que les colonies coliennes, mais cependant très distinctes à l'œil nu, d'un blanc bleuté, ne donnent jamais lieu à une production de gaz : superficielles, elles ont toujours un aspect bleuté, et une certaine ressemblance avec des moisissures ; elles peuvent, dans ce dernier cas, atteindre un diamètre d'environ un centimètre.

Nous avons tenté un certain nombre d'expériences, dans le but de savoir si ce procédé est vraiment pratique dans son application et dans ses résultats. Dans ce cas, comme d'ailleurs dans toutes les autres séries d'expériences que nous avons pratiquées au sujet d'autres procédés de diagnose, nous avons opéré avec des cultures de bacille d'Eberth et de bacille Coli authentiques, d'abord isolément, puis simultanément

à l'état de mélange : en dernier lieu nous avons opéré sur des mélanges d'Eberth et de microbes variés ainsi qu'avec des mélanges de Coli et de microbes des eaux.

Les résultats que nous avons obtenus dans ces recherches ne sont pas en faveur du procédé que préconise M. Remy. Nous devons tout d'abord dire, que la gélatine proposée n'est que très peu à l'abri des colonies liquéfiantes, ce qui est déjà fort nuisible au succès des recherches bactériologiques. Des matières fécales de mouche ayant étéensemencées en bouillon ordinaire, et ce bouillon ayant servi à monter quelques plaques de gélatine différentielle, aucune de ces plaques n'est restée solide : toutes ont subi une liquéfaction complète. D'autre part, les microbes vulgaires pullulent très bien sur cette gélatine : nous avons pu y retrouver facilement le *B. prodigiosus*, le *B. mesentericus vulgatus*, le *B. vert de l'eau.*, etc.

Un autre inconvénient est que, à la température maxima de 21°, il est nécessaire d'attendre en moyenne quatre à cinq jours avant de pouvoir nettement distinguer une colonie : la différenciation macroscopique des colonies coliennes et éberthiennes, lorsqu'elle est possible, ne l'a pas été avant le cinquième ou le sixième jour. Puis, à ce moment, il faut procéder au repiquage des colonies suspectes pour effectuer leur identification. Nous devons dire que dans un cas de mélange d'Eberth avec le *Streptococcus pyogenes*, nous n'avons eu qu'un seul ballon contenant un bacille, sur une série de trente-deux ballons ensemencés par repiquage de colonies développées sur une même plaque de gélatine différentielle.

Au point de vue de la recherche du bacille d'Eberth, nous ne croyons donc pas que le procédé de M. Remy soit véritablement supérieur aux autres procédés connus, car les indications qu'il donne, en outre qu'elles sont très longues à obtenir, ne peuvent être que d'un très faible secours.

CHAPITRE II

Milieux liquides. — Acide phénique

A. — PROCÉDÉ DE VINCENT

M. H. Vincent (40) n'est pas partisan de la culture en plaque de gélatine phéniquée. Quoique très bonne, dit-il, cette méthode n'est pas applicable vu la faible quantité d'eau que l'on doit seulement ensemer. Aussi, pour permettre d'opérer sur de plus grandes quantités de liquide, préconise-t-il un bouillon phéniqué suivant la formule suivante :

Bouillon simple..... 10 cent. cubes

A. phénique 5 p. 100.... V gouttes.

Ce bouillon est réparti dans des tubes : on y verse alors cinq à six gouttes de l'eau à analyser. On prépare ainsi ainsi six tubes, qui, recouverts d'un capuchon de caoutchouc pour éviter l'évaporation, sont portés au bain-marie à 42°.

Si le bouillon devient louche, ce qui se produit environ douze heures après, aussitôt qu'il commence à louchir, on ensemence une öse de chacun des tubes dans six nouveaux tubes de bouillon phéniqué, en même temps qu'on ensemence une öse dans du bouillon ordinaire, et ainsi de suite jusqu'à ce que le bouillon neutre donne une seule espèce; ce qui arrive au plus tard au quatrième passage; à ce moment-là, les saphrophytes, même les plus résistants, tels que le *B. subtilis*, *B. de la pomme de terre* surtout, ont été laissés en arrière par la précocité des ensemencements et l'action antiseptique de l'acide phénique.

B. — PROCÉDÉ DE PÉRÉ

Le procédé de *Péré* (43) dont nous avons déjà parlé, mais seulement au point de vue de la concentration des microbes des eaux par pullulation à l'étuve en milieu nutritif, se complète par l'addition à cette solution peptonée, d'une certaine quantité d'antiseptique, en vue d'empêcher la pullulation trop forte de bactéries indifférentes qui seraient nuisibles à la recherche des espèces pathogènes.

Péré transforme donc son bouillon-eau-peptone en un bouillon phéniqué électif, par l'addition d'une quantité d'acide phénique, égale à deux centimètres cubes de solution à 5 p. 100, pour 100 centimètres cubes de bouillon. C'est alors seulement qu'il porte les différents ballons où il a réparti son liquide, à l'étuve réglée à 34°.

Après un certain temps d'étuve, 15 à 20 heures

environ, 30 heures au maximum, on prend avec un fil de platine, une öse du liquide des ballons qui se sont troublés et on en fait, sans attendre un nouveau trouble, 2 et 3 passages en bouillon phéniqué à 1 gr. d'acide phénique pour 100 de bouillon.

A ce moment, on a, dit M. Péré, des cultures pures de Colibacille ou d'Eberth, ou bien encore des mélanges de ces deux espèces bacillaires, mais seulement de celles-là. On peut, d'ailleurs, les reconnaître et on le doit, si l'on veut les identifier, par la méthode des cultures en plaques de gélatine. A partir de ce moment, on fera subir aux bacilles isolés, les différentes manipulations permettant de les reconnaître comme étant du Coli ou de l'Eberth : lait, tournesol.

Telle est la technique de la méthode.

On le voit, les méthodes de Vincent et de Péré sont analogues dans leur principe : l'action de l'acide phénique. Mais chacun de ces auteurs leur donne un cachet particulier. Péré opère sur de grandes quantités ; Vincent fait pousser ses cultures à la température de 42°.

Ayant eu besoin de nous procurer un échantillon de Coli normal, nous avonsensemencé dans du bouillon peptone neutre ordinaire, des parcelles de matières fécales d'homme sain. En même temps, et pour expérimenter la méthode d'isolement par l'acide phénique, nous avonsensemencé un certain nombre des ballons déjàensemencés, avec une culture pure de *Streptococcus pyogenes*. Une fois ces ballons fertiles, nous

leur avons fait subir à tous les mêmes manipulations : réensemencements successifs au moindre trouble d'abord, puis sans attendre l'apparition de ce louche. Ces opérations se passaient dans le bouillon phéniqué selon la formule de M. Péré, et une moitié des cultures végétait à 37°, l'autre moitié étant à 44°. Nous examinions microscopiquement et à de nombreuses reprises, le contenu des ballons, et au cinquième jour, nous n'étions pas parvenus à obtenir une culture pure de bacilles : le *Streptococcus* contaminait toujours le bouillon phéniqué.

Comme ces faits se produisaient dans tous les ballons contaminés par la culture du *Streptococcus* ou par d'autres cocci intestinaux, nous n'avons pas cru devoir poursuivre plus loin nos investigations, et nous avons été obligé d'avoir recours à un autre procédé pour isoler le *Coli* que nous désirions.

C. — PROCÉDÉ DE PARIETTI-WITTLIN

Parietti (36) avait constaté que le développement du bacille d'Eberth dans une culture quelconque dépend de la quantité de semence introduite et de la quantité d'antiseptique, ici encore l'acide phénique, que l'on ajoutait au milieu de culture pour le rendre électif. En conséquence, un même bouillon pouvait devenir fertile, suivant que les germes ensemencés étaient nombreux ou rares et, d'autre part, pour une même quantité de semence, telle culture additionnée de 5 p. 1000 d'acide phénique ne poussait pas, alors qu'avec 3 p. 1000 elle présentait un trouble manifeste. C'est à la suite de

ces constatations que Parietti imagina la méthode suivante :

Il prépare d'abord une solution antiseptique titrée, ainsi formulée :

Phénol.....	5 gr.
HCl.....	4
Eau distillée.....	100

puis dispose des tubes à essai, contenant chacun 10 centicubes de bouillon peptone à 3 p. 100, en trois séries. Aux tubes de la première série, il ajoute 3 gouttes de la solution antiseptique ; 6 gouttes à ceux de la seconde et 9 à ceux de la troisième. Il ensemence dans chaque série, chaque tube avec respectivement 1, 2, 3, 4... 15 gouttes de l'eau à analyser et les place à l'étuve à 37°. Dans de telles conditions, les eaux ordinaires ne troublent généralement, au bout de quarante-huit heures environ, que les tubes contenant le moins d'antiseptique et le plus d'eau. Si le bacille typhique ou le colibacille existent dans ces eaux, le trouble apparaîtra environ dans les vingt-quatre heures. Il faut alors ensemer en plaques de gélatine, isoler et identifier.

Quelques années plus tard, M. *Wittlin* (122), examinant la valeur de ce procédé, remarqua qu'un très grand nombre de tubes demeuraient stériles, et que, lorsqu'on opérait avec des dilutions d'Eberth dans l'eau stérilisée, c'était régulièrement le tube qui avait reçu le plus d'eau et le moins d'antiseptique qui se

troublait le premier ; il remarqua aussi que si les dilutions étaient très étendues, on pouvait fort bien ne plus pouvoir retrouver le bacille, vu la petite quantité d'eau ensemencée. Aussi apporta-t-il au procédé primitif de Parietti quelques modifications.

On prépare, conseille-t-il, trois ballons que l'on remplit respectivement avec 1, 9 et 90 centicubes de l'eau à analyser. Le premier recevra alors 9 centicubes d'eau peptone à 2 p. 100, le second recevra 1 centicube d'une solution peptonée à 20 p. 100, et le troisième 10 centicubes de la même solution. Les deux premiers ballons recevront chacun 4 gouttes de la solution acide de Parietti ; le troisième 40 gouttes.

Entrepreuant avec ce milieu deux séries d'expériences, M. Wittlin a recherché : 1° Quelles étaient parmi la flore bactérienne des eaux, les espèces susceptibles de se développer dans de tels milieux de culture ; et 2° s'il était nécessaire d'ensemencer un grand nombre de bactéries pour obtenir leur développement.

De la première série de ces expériences, il résulte qu'un certain nombre de bactéries pathogènes, comprenant la plupart de celles qui vivent habituellement dans l'intestin, se développent assez abondamment dans un tel milieu.

La seconde série d'expériences montre que la fécondation est facile quelle que soit la quantité d'eau ensemencée.

Nos expériences ont complètement confirmé le dire de M. Wittlin, lorsqu'il avance que, seuls poussent en général, les tubes de Parietti les plusensemencés et les moins antiseptiques à la fois ; mais en outre, nous lui ferons un autre reproche, ainsi qu'à la méthode suivante que nous allons décrire tout d'abord.

D. — PROCÉDÉ DE POUCHET-BONJEAN

En 1896, MM. *Pouchet et Bonjean* (138), faisaient connaître un procédé d'isolement de l'Eberth et du Coli d'avec les autres espèces aquatiles. Ce procédé était d'ailleurs bien plutôt une modification d'un procédé préconisé six ans auparavant par l'un d'eux, M. *Pouchet*.

Voici la technique employée :

On ensemence directement avec l'eau à analyser deux séries de fioles Pasteur :

a) Les unes renferment 10 centicubes de bouillon auxquels on ajoute 30 centicubes d'eau ;

b) Les autres renferment 10 centicubes de bouillon auxquels on ajoute 150 centicubes d'eau.

Cela fait, au moyen d'une solution titrée d'acide phénique, on rend ces milieux phéniqués au titre de 1 p. 1.000. Puis, le tout est placé à l'étuve à 42° : et sur ces fioles, on fait les expériences suivantes :

1° Réensemencement en eau peptone à 2 p. 100 ;

2° Ensemencement sur plaques d'Elsner.

MM. Pouchet et Bonjean se servent alors pour reconnaître le bacille Coli, de trois ordres de caractères :

- a) Les caractères des cultures sur lait, gélatine, pomme de terre, gélose;
- b) La séro-réaction;
- c) L'expérimentation physiologique [dont la priorité revient à M. G. Roux (143)].

De l'avis même des auteurs du procédé, il est bon d'attendre que les cultures de seconde génération soient âgées de huit jours au moins, avant d'entreprendre les expériences d'isolement et de différenciation.

Quoique ce procédé mérite d'être retenu pour la quantité notable d'eauensemencée, et pour l'emploi des températures dysgénésiques dont nous ne nions pas l'utilité en la matière, nous ne nous y attarderons pas, car des expériences de contrôle, faites avec un certain nombre de bacilles ou cocci ordinaires des eaux, tendent à infirmer la grande valeur des résultats que paraissait donner cette méthode. Nous avons vu en effet, dans une série d'expériences, les *B. mesentericus vulgatus*, *B. prodigiosus*, *Stroptococcus*, etc., résister fort bien à plusieurs passages en milieu phéniqué, répétés à des intervalles de temps excessivement courts.

Mais nous avons voulu savoir aussi, quelle était l'action de l'acide phénique sur le bacille d'Eberth lui-même; nous avonsensemencé du bacille typhique dans du bouillon phéniqué (V gouttes de solution phéniquée à 1 p. 20 pour 10 centicubes de bouillon).

Nous avons d'abord constaté que le bacille Coli poussait très abondamment en un maximum qui a

varié entre 16 et 20 heures, tandis que les cultures typhiquesensemencées au même moment que les cultures coliennes, n'ont commencé à être visibles qu'à partir de la 30^e heure (1 fois) et en moyenne, pas avant le troisième jour de culture.

L'acide phénique n'est donc pas sans action sur la vitalité du bacille d'Eberth, et si cet agent est avantageux pour éliminer les bactéries inoffensives, il est dans une certaine mesure nuisible au succès même de la méthode, en paralysant la vigueur et la vitalité du bacille typhique.

CHAPITRE III

Autres antiseptiques

C'est devant ces insuccès que l'on a songé à opposer à la pullulation des espèces indifférentes, l'action d'antiseptiques autres que l'acide phénique et qui n'auraient pas l'inconvénient de ce dernier. Nous citerons dans cet ordre de faits les modifications qui ont été proposées par M. *MacConkey* (176).

Cet auteur part des deux faits bien connus suivants :

1^o Les sels biliaires jouissent de propriétés antiseptiques et sont précipités quand ils sont mis en présence de corps acides;

2^o Le bacille *Coli Communis* produit un corps à réaction acide (*acide succinique*), lorsqu'il se trouve

en présence de la lactose, tandis que le bacille d'Eberth n'en produit pas.

Partant de ces deux principes, il fabriqua le milieu de culture suivant :

Glycocholate de Na	0 gr. 5
Peptone	1 gr. 5
Lactose.....	0 gr. 2 à 0,5
Agar-agar.....	1 gr. 5
Eau distillée	100 grammes.

On ajoute le lactose après filtration.

Sur un tel milieu, les colonies typiques et les colonies coliennes produiraient des résultats assez différents pour qu'on puisse de là, en faire le diagnostic différentiel. D'un autre côté, les microbes des eaux ne voient pas non plus encore leur pullulation être entravée sérieusement.

MM. *Drigalski et Conradi* (217), ayant examiné la valeur de cette méthode, ont jugé qu'il était préférable de substituer au glycotaurocholate de soude (car le sel biliaire n'était jamais exactement pur), un autre antiseptique, le krystall-violet de Höchst. Pour le moment, nous laisserons de côté cette dernière méthode, nous promettant d'y revenir plus amplement dans le courant de cette étude.

CHAPITRE IV

Chaleur

PROCÉDÉS DE RODET, DE POUCHET ET BONJEAN

En dehors des antiseptiques, on s'est aussi préoccupé de trouver d'autres agents dysgénésiques capables d'entraver aussi complètement que possible la pullulation des microbes vulgaires, tandis que les bacilles d'Eberth et Coli, pourraient encore avec facilité, végéter et croître en présence de ces mêmes agents.

Une nouvelle méthode, l'emploi d'une température relativement élevée, est née d'une constatation clinique.

Dans une longue série d'autopsies et de recherches sur des typhiques vivants, MM. Bard et Aubert ont constaté la présence constante et pour ainsi dire unique des bacilles d'Eberth et Coli. Or, la température rectale des typhiques, monte assez souvent à 41°, et même 42° : le bacille typhique et le bacille coli résistent donc à de telles températures, tandis que les autres microbes intestinaux sont détruits, puisque les matières fécales de ces malades ne donnaient que des cultures pour ainsi dire pures de ces deux bactéries.

MM. *G. Roux et Rodet* (38), MM. *Pouchet et Bonjean* (138), ont transporté cette donnée en bactériologie pour isoler l'Eberth et le Coli : les uns avec du bouillon

peplone ordinaire, les autres concurremment avec l'emploi des bouillons phéniqués.

Nous n'avons fait à ce sujet aucune série complète d'expériences suivies. Les résultats épars que nous possédons néanmoins sont assez nombreux pour nous autoriser à faire quelques remarques à ce sujet.

Nous sommes parfaitement à même de constater qu'une température assez élevée, 44°5 par exemple, si elle entrave la pullulation de certains microbes, faciles d'ailleurs à distinguer des espèces qui nous préoccupent, ne permet pas cependant d'éliminer rapidement les microbes indifférents qui viendront gêner les recherches. Les microbes tels que *B. mesentericus vulgatus*, *B. prodigiosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*... peuvent très bien être retrouvés encore très vivaces, après quatre et cinq passages à 6 heures de distance à la température dysgénésique de 44°5.

Cependant, il est à noter et à considérer, que, si l'on se trouve en présence d'un bacille *mobile*, à forme fréquemment diplobacillaire, *ne prenant pas* le Gram, et *rougissant* la teinture bleue de *tournesol* en bouillon lactosé, et que ce bacille *fructifie abondamment* encore à la température de 44°5, on a toutes raisons de se dire en face d'un bacille d'Escherich.

En résumant dès lors les quelques notions qui ressortent de l'examen des quelques procédés qui cherchent à isoler le bacille d'Eberth ou le bacille d'Escherich d'avec les autres microbes aquatiques, nous nous voyons forcé de reconnaître qu'on ne possède pas

encore de milieu électif véritablement digne de ce nom. En attendant le jour où un tel milieu existera, s'il existe jamais, s'il est une technique qu'il soit préférable de suivre, nous sommes porté à croire, par les quelques résultats que nous avons obtenus, que la culture en bouillon phéniqué à 1 p. 1000, et à 44°5, avec réensemencements fréquents, au moins toutes les six heures, peut permettre d'arriver à isoler à peu près les bacilles d'Eberth et d'Escherich.

TROISIÈME PARTIE

Procédés d'isolement de l'Eberth d'avec le Coli

Nous voici arrivés à la troisième étape de nos recherches. Nous avons déjà recueilli sûrement les bacilles typhiques et Coli qui pouvaient se trouver dans l'eau que nous voulions examiner : nous avons même supprimé complètement, ou presque, toutes les espèces microbiennes indifférentes qui pullulent dans les eaux polluées.

Il s'agit maintenant pour nous de savoir s'il est possible de connaître un milieu véritablement électif et exclusif, qui nous permette de dire de tel bacille, poussant dans telles conditions, que ce bacille est bien un bacille d'Eberth ou un bacille Coli. Cette différenciation d'ailleurs ne laissera pas que d'être difficile, car il est à remarquer que les caractères distinctifs du bacille d'Eberth, sont presque tous des caractères négatifs.

De nombreux auteurs ont pensé que certains milieux de culture pourraient, étant plus favorables à l'Eberth qu'au Coli, permettre le diagnostic positif du bacille typhique et chacun a donné un procédé destiné à faciliter la pullulation de ce même bacille.

CHAPITRE PREMIER

Procédé d'Elsner

En 1895, *Elsner* (82), essaya l'action d'un très grand nombre de substances ajoutées à des milieux de culture variés. Il s'arrêta à une gélatine au suc de pomme de terre additionnée d'iodure de potassium. Voici la formule de cette gélatine.

500 grammes de pommes de terre sont râpées et mises à macérer pendant quatre heures; puis on laisse déposer pendant toute une nuit. On décante le liquide, on le filtre et on y ajoute de 15 à 20 pour 100 de gélatine. On alcalinise jusqu'à ce que le tout ne soit plus que très légèrement, mais encore acide. On filtre encore et on stérilise; on ajoute une certaine proportion d'iodure de potassium, 1 %, à ce milieu, juste au moment de s'en servir.

Les colonies éberthiennes mettent environ 48 heures à pousser sur un tel milieu, et restent petites, punctiformes et incolores; les colonies coliennes au contraire

poussent rapidement et en 24 heures, on se trouve en présence de colonies typiques, épaisses et d'un brun jaunâtre.

Acceptée de suite, et encore aujourd'hui, par les bactériologistes allemands, la gélatine dite « *gélatine d'Elsner* » fut critiquée, puis modifiée par *Grimbert*.

Cet auteur (103), constatant les bons résultats qu'avaient obtenus MM. *Brieger* (79) et *Lazarus* (84), constate aussi le peu de succès qu'avait eu cette méthode entre les mains de MM. *G. Roux* (116) et *P. Courmont* (96).

Puis il propose une modification à la composition chimique de cette gélatine (*V. Grimbert loc. cit.*), et donne les résultats auxquels il est parvenu. Il est d'ailleurs complètement d'accord pour ses conclusions avec MM. Roux et P. Courmont. Pour ces auteurs, il est évident que la réaction du milieu d'Elsner est due en grande partie à l'acidité de la gélatine et non à la présence du jus de la pomme de terre. M. Grimbert propose donc d'établir un taux d'acidité fixe afin d'avoir un milieu dont les résultats soient toujours comparables entre eux.

Quant à la valeur du milieu d'Elsner, les travaux des auteurs précédents les conduisent à formuler sur elle l'appréciation suivante :

Milieu excellent, lorsqu'on a affaire à des mélanges fixes d'Eberth et de Coli, mais de peu de valeur pour l'examen bactériologique des selles typhiques, où le bacille Coli prend souvent l'aspect éberthiforme. D'ailleurs la gélatine d'Elsner n'a permis à ces auteurs de retirer le bacille typhique des selles que dans une

proportion de 1 pour 5 cas. Les microbes liquéfiant poussent aussi très facilement sur cette gélatine.

Nous avons tenu nous aussi à vérifier la valeur des assertions de ces auteurs ; nous avons donc préparé la gélatine différentielle à la pomme de terre d'après la formule classique. De nombreuses expériences nous ont prouvé que ce milieu ne possédait vraiment pas tous les avantages que lui prêtait Elsner ; et, il nous semble même, qu'aujourd'hui, où nous possédons d'autres milieux électifs et différentiels, le milieu d'Elsner va en perdant de plus en plus de sa valeur.

Nous avons réussi en effet à y faire pousser notre série ordinaire de microbes aquatiques. *B. prodigiosus* et *B. vert de l'eau* ont poussé fort bien sur cette gélatine, en 24 heures, en moyenne. D'autre part, nous reprocherons aussi à ce milieu, la facilité avec laquelle les colonies liquéfiantes peuvent se développer à sa surface. En combinant nos mélanges microbiens, nous avons vu un grand nombre de plaques et des tubes d'Esmarch, rendus liquides en une trentaine d'heures.

Nous ferons d'ailleurs à cette méthode, le reproche commun à tous les milieux à la gélatine. Il devient difficile de se servir de ces milieux pendant la saison chaude, alors qu'une température de 22° est facilement atteinte dans un laboratoire, même abrité. Il ne faut pas que cette température dure longtemps pour que la fusion puisse se produire ; et, de suite les colonies seront confondues, et la plaque ou le tube rendus inutiles.

Pour toutes ces raisons : faible pouvoir électif, liquéfaction possible et fréquente, diagnose diffi-

cile entre le bacille typhique et les Colibacilles, nous écarterons le milieu d'Elsner des milieux propres à faciliter la différenciation du B. d'Eberth et du B. d'Escherich.

CHAPITRE II

Milieu de Pierkowski

Nous ne parlerons pas ici des milieux à l'urine qu'avait préconisés le Dr *Pierkowski* dans ses premières communications (109). Acceptant à priori l'opinion qu'il émet plus tard nous ne nous occuperons que du nouveau milieu à l'urine qu'il préconisait il y a tantôt 2 ans. Le milieu qu'il proposa (162) donnerait à son avis des résultats beaucoup plus rapides et beaucoup plus nets que les milieux dont il s'était servi jusque là. Il prépare ainsi sa *gélatine à l'urine*.

« On prend de l'urine normale recueillie depuis deux
« jours et d'une densité de 1,020, et qui a pris dans
« l'intervalle une réaction alcaline; on y ajoute
« 0,50 p. 100 de peptone et 3,30 p. 100 de gélatine. On
« chauffe 1 heure à l'autoclave à 100° et on filtre
« aussitôt. Puis, on répartit en tubes à essais, et on
« stérilise à l'autoclave à 100° pendant environ un
« quart d'heure. Cette stérilisation doit être renou-
« velée le jour suivant, pendant dix minutes seule-
« ment, pour ne pas trop gêner ensuite la solidifica-
« tion de la gélatine. »

D'après l'auteur du procédé, après un séjour d'environ vingt heures à l'étuve réglée à 22° centigrades, on voit apparaître deux sortes de colonies pour les plaques où on aensemencé simultanément le bacille d'Eberth et le bacille coli communis.

A un faible grossissement, certaines de ces colonies se montrent arrondies, jaunâtres, avec de petites granulations et des bords tranchants : ce sont des colonies coliennes ; d'autres, au contraire, les colonies éberthiennes, semblent exclusivement formées de filaments radiés, disposés en étoile, et pour la plupart, sinueux, en forme de spirilles. Que d'ailleurs, les ensemencements proviennent, soit de cultures pures, soit de déjections de typhiques, l'auteur a toujours constaté la fixité de ces apparences macroscopiques des cultures.

A priori, il semble bien étonnant qu'on puisse obtenir avec un tel milieu de culture, des colonies, d'apparence toujours la même. En effet, quoi de plus variable que la composition chimique de l'urine ?

N'est-il pas reconnu que la formule de ce mélange si complexe varie dans des proportions tout à fait considérables, du matin au soir, et, à plus forte raison d'un jour à l'autre ? L'alimentation elle-même du sujet qui fournit l'urine, possède une assez grande influence sur les variations quantitatives des principes qui y sont dissous. Qu'en sera-t-il dès lors, si l'on emploie des urines de provenance différente, quoique toutes émises par des sujets normaux ?

A ces questions complexes et diverses, l'expérience a répondu par des résultats tout aussi complexes et

tout aussi divers. Dans certains cas, nous avons eu des cultures répondant au type qui en a été tracé par M. Pierkowski; c'étaient de grosses colonies coliennes jaunes et à bords tranchants, de fines colonies éberthiennes à nombreuses branches. Avec une gélatine préparée de la même façon, mais avec une urine différente, il nous a été impossible de constater l'existence, même après trois jours, d'une seule colonie en étoile rameuse. Quoique ces expériences aient été reprises plusieurs fois de suite, nous n'avons jamais eu de résultats absolument concordants.

Non pas que nous voulions dire par là que le principe de la méthode manque de valeur; mais nous pensons seulement, que tant qu'on n'aura pas créé de toutes pièces une liqueur analogue à l'urine, mais de formule fixe, on ne pourra jamais avoir de résultats vraiment intercomparables.

Cet inconvénient, qui vicie la méthode de M. Pierkowski dans son origine même, n'appartient pas seulement à son procédé. On en peut dire, à priori, tout autant de tout procédé qui emploie des liquides de composition chimique variable.

On pourra objecter à ces raisons, que la composition chimique de nos bouillons peptones est tout aussi variable que celle de l'urine. La chose est certaine en principe : mais, en pratique, il y a une forte question de degré. D'ailleurs, pratiquement, une solution dans l'eau distillée salée à 1 p. 100, de 3 ou 4 grammes de peptone Defresne, sera, croyons-nous, d'une constitution plus invariable que le milieu de Pierkowski. Il est assurément vrai, que l'on ne se

trouvera dans des conditions vraiment scientifiques, que le jour où, par exemple, on aura opéré chimiquement la synthèse élémentaire d'un corps albuminoïde, lequel aura dès lors une formule chimique fixe et se retrouvera toujours identique à lui-même.

Jusque là, nous croyons néanmoins qu'une solution titrée de peptone Defresne ou autre, mais fixée immuablement dans une formule, permettra de compter sur des résultats comparables entre eux, autant, et nous dirons même davantage, que le milieu de Pierkowski et similaires.

CHAPITRE III

Milieux lactosés

A. PROCÉDÉ DE CHANTEMESSE

Dans la *Presse Médicale* du mercredi 16 juillet 1902, M. le professeur *Chantemesse* (215) préconise pour reconnaître et isoler le bacille d'Eberth, le séparer du bacille coli communis, une gélose spéciale, où il pense répondre aux desiderata des bactériologistes, par l'addition d'acide phénique, de lactose et de teinture de tournesol. Il se fonde pour établir sa méthode sur l'action de l'acide phénique vis-à-vis des microbes vulgaires, tandis que sa présence n'entrave nullement la pullulation du Coli et de l'Eberth. Mais dès lors, en présence de la lactose, le Coli, la faisant fermenter

produit de l'acide lactique qui fera virer au rouge la teinture de tournesol. En résumé, c'est l'application de la réaction de *Wurtz*.

« Cette gélose neutralisée est préparée de la manière
« suivante: eau peptone (Dufresne) 3 pour 100, gélose
« 2 pour 100, lactose 2 pour 100. Quand cette gélose
« est liquéfiée et avant d'être versée dans les plaques
« de Pétri, on ajoute, pour une quantité de 10 cc de
« gélose, quatre gouttes d'une solution aqueuse d'acide
« phénique cristallisé à 3 pour 100, et 1 cc de teinture
« de tournesol sensible. Sur trois ou quatre plaques de
« Pétri, renfermant cette gélose phéniquée, lactosée
« et tournesolée devenue solide, on ensemence le résidu
« obtenu par filtration (Voyez, Première partie, Cha-
« pitre II).

« On recueille les colonies qui se sont développées
« au bout de deux heures, et on les ensemence dans
« un tube d'eau peptone contenant un peu de sérum
« agglutinant. Quelques heures plus tard, le bouillon
« est clair et les colonies typhiques développées sont
« rassemblées au fond du tube par le fait de l'aggluti-
« nation. Tout tube troublé uniformément ne contient
« pas le bacille typhique, ou du moins ne le contient
« pas à l'état de culture puré ».

Telle est la marche à suivre d'après le professeur Chantemesse, dans la recherche du bacille typhique, au moyen d'une gélose phéniquée, lactosée et tournesolée. Et telle est en effet la marche que nous avons suivie en l'adaptant aux circonstances; ce sont ces circonstances qui nous ont obligé à lui faire subir quelques légères modifications de détail.

Ainsi, nous avons été obligé, à la suite de plusieurs échecs dans la préparation de la gélose, de porter le taux de l'agar-agar de 2 à 4 pour 100. Il est constant en effet, que dans le cas présent, l'agar-agar joue comme rôle le plus important, un rôle de soutien. Nous avons dû de même augmenter la dose de tournesol sensible et la porter de 1 à 2, 5 pour 10 de gélose. Qu'il nous soit permis en passant, de conseiller la stérilisation indépendante de cette teinture de tournesol, la stérilisation en bloc, le mélange une fois déjà fait, nous ayant donné des mécomptes, parmi lesquels nous compterons un virage (décomposition?) spécial qui, au lieu de communiquer à la gélose une teinte bleue, lui donne une couleur un peu brunâtre. Mais ceci n'est qu'un point de pratique, qu'un tour de main spécial fait éviter.

Néanmoins, nous avons expérimenté la valeur de ce milieu nutritif, en tant que milieu électif (puisque phéniqué), et différentiel (puisque tournesolé): nos expériences répétées à de nombreuses reprises, tantôt avec des Eberth ou des Coli isolés, tantôt avec des mélanges divers d'Eberth et de Coli, tantôt enfin avec des mélanges d'Eberth et de Coli avec d'autres microbes, nous ont conduit aux résultats suivants :

Lorsqu'on a affaire à un seul bacille déjà isolé, et qu'on l'ensemence sur cette gélose bleue, on peut arriver à avoir un résultat au bout de 4 à 5 jours; mais ceci n'est pas du tout constant. Quelquefois, le diagnostic reste un peu hésitant, souvent nous n'avons pu le faire. Dans le cas de mélanges connus à l'avance de bacilles d'Eberth et de bacilles Coli, le diagnostic,

déjà épineux dans le cas précédent devient alors véritablement difficile. Nous avons essayé d'obtenir de bonnes réactions différentielles, en diluant à l'extrême nos cultures d'inoculation, mais sur 12 expériences ainsi conduites, nous n'avons jamais pu avoir un résultat vraiment satisfaisant.

Il en a été d'ailleurs de même dans les expériences qu'envisage la troisième hypothèse ; microbes vulgaires, saprophytes, *levures même*, poussent sur ce milieu, et si quelques rares fois, une colonie nous présentait une vague teinte bleuâtre ou rougeâtre, elle était absolument perdue au milieu d'une abondante pullulation de microbes faisant tache d'huile avec d'énormes colonies épaisses et en larges gâteaux d'un blanc jaunâtre.

Les résultats ont d'ailleurs été confirmés par des recherches simultanées, entreprises dans le même laboratoire par un de nos amis, le docteur Lacomme, et nous ne pouvons terminer ce court aperçu de la méthode de M. le professeur Chantemesse, qu'en regrettant les mécomptes qu'elle nous a donnés et les quelques inconvénients qu'elle présente. Nous les résumerons rapidement : méthode lente, demandant un délai d'environ quatre jours au moins ; peu élective et partant peu pratique.

B. — MÉTHODE DE A. S. GRUNBAUM ET E. H. HUME

Le 14 juin 1902, paraissait dans le *British Medical Journal* (page 1473) une note signée *S. Grünbaum* et *H. Hume*, intitulée : « Note on media for distin-

guishing *B. coli*, *B. Typhosus* and related species ».

S. Grünbaum (218 bis) y donne les résultats obtenus au moyen du milieu de Mac-Conkey (taurocholate-lactose-agar) et *Hume* (218 bis), ceux obtenus en substituant au taurocholate de soude, comme agent inhibiteur, le *Krystall-violett* (1) suivant *Drigalski et Conradi* (217). Ces deux auteurs concluent en donnant la préférence, comme clarté des résultats acquis, à un milieu composé de la manière suivante :

Agar.....	2 gr.
Peptone.....	2 gr.
Eau.....	100 cc.

Après dissolution, alcaliniser avec 0 cc. 4 de solution normale de soude. Le tout une fois filtré et stérilisé, on ajoute :

Lactose 1 gr.

Rouge neutre $\frac{0,5}{100}$ 1 cc.

Krystall-violett q. s. p. $\frac{1}{100.000}$ du volume total.

stérilisation dernière au stérilisateur de Koch pendant 15 minutes. Telle est la formule de ces auteurs.

De nombreux échecs dans la préparation de différentes géloses (*gélose de Chantemesse*, *gélose de Hume*), nous ont constamment montré qu'une proportion d'agar, inférieure à 3,4 ou 5 pour 100 du volume

(1) KRYSTALL-VIOLETT. — Forme commerciale du violet de méthyle : *méthyltriamidotriphénylméthane*.

total, était notoirement insuffisante, et pour avoir une gélose qui « tienne », nous avons employé la formule suivante :

Agar.....	10 gr.
Peptone.....	5 gr.
Eau.....	220 cc.

neutraliser exactement et alcaliniser ensuite avec :

NaOH décinormale	10 cc.
------------------------	--------

ajouter après filtration et stérilisation :

Lactose	2 gr. 5
Rouge neutre à $\frac{5}{100}$	0 cc. 25
Krystall violett $\frac{1}{100.000}$	25 cc.

Les quantités introduites dans cette formule sont proportionnelles à celles qu'indiquent les auteurs du procédé, à l'exception de l'agar dont nous avons doublé la dose, pour avoir un meilleur résultat au point de vue de la bonne tenue de la gélose.

Quelles sont les conclusions de ces auteurs? Les voici textuellement :

« Nous trouvons qu'un milieu gélosé-lactosé, où on
« a ajouté concurremment du Rouge-Neutre et du
« Krystall-Violet (1/100.000^e), permet de faire une
« différence frappante entre les colonies; les *B. coli*
« sont rouges, mais les *B. typhiques* (ainsi que le
« *bacillus enteritidis* de *Gaertner* et d'autres) sont
« bleu tirant sur le pourpre. L'effet est beaucoup plus

« frappant après quarante-huit heures, qu'après vingt-quatre heures. Les cultures les plus typiques sont celles où a étéensemencé un mélange connu de bactéries, par exemple *B. coli* et *B. typhique*. »

Les expériences que nous avons faites sur un milieu ainsi compris, nous ont montré qu'en effet cette gélose était suffisamment, non pas élective, mais différentielle. Ce n'est pas à dire qu'il y ait une différence de rapidité dans la pullulation des colonies éberthiennes ou coliennes : non. Mais on peut assez facilement distinguer une auréole bleuâtre dans le cas de cultures typhiques et rougeâtres dans le cas de cultures coliennes.

Les ensemencements que nous avons faits, ayant été pratiqués avec de nombreux échantillons d'Eberth et de Coli et nous ayant donné toujours des résultats conformes aux assertions des auteurs du procédé, nous ne croyons pas exagéré de reconnaître à cette réaction une assez grande valeur diagnostique.

Nous avons voulu compléter un peu l'étude de cette gélose, en nous en servant comme milieu de culture pour des bacilles divers; et, pour cela nous avons utilisé la série suivante de microbes :

Coli N; *Eberth W*; *Prodigiosus*; *B. vert de l'eau*; *B. Subtilis*; *Coli R*; *Eberth For*; *Mesentericus*; *Choléra*; *Eberth Mou*; *Staphylocoque*; *Coli Ch*.

A la suite de ces ensemencements, nous avons noté de nouveau la fixité de la réaction de l'Eberth et du Coli, vis-à-vis de la gélose de MM. Drigalski et Conradi; mais, en outre, nous avons constaté que *Prodigiosus*, *B. vert de l'eau*, *Mesentericus*, se con-

duisent vis-à-vis de ce milieu, à la manière des Coli, et que *Vibrio cholerae* se conduisait comme un Eberth. Nous ne faisons ici que constater ce simple fait, sans vouloir l'expliquer. Nous le retrouverons d'ailleurs plus loin.

Après de telles constatations, les seules conclusions que nous puissions formuler vis-à-vis de mélanges fixes Eberth-Coli, ou vis-à-vis de ces mêmes microbes isolés, sont que la gélose de Drigalski et Conradi est un excellent moyen de diagnostic. Si d'autre part on a affaire à des mélanges inconnus, cette méthode pourra être utile pour séparer en deux classes : éberthiformes et coliformes, les différents bacilles ou cocci, que l'on voudra isoler ou identifier : quitte à reporter ces espèces microbiennes sur d'autres milieux pour parachever leur identification définitive. Nous reconnaitrons de plus que l'action antiseptique du Krystall-Violet permet de faire le diagnostic, ou du moins de le prévoir, dès quarante-huit heures d'étuve au maximum.

C'est donc un des procédés de choix auxquels nous nous adresserons pour faire plus tard le diagnostic différentiel des bacilles typhique et coli.

CHAPITRE IV

Vaccination des Milieux

En 1887, MM. *Chantemesse et Vidal* (13) remarquaient une propriété très curieuse des milieux de culture du bacille d'Eberth.

Si l'on ensemence ce bacille en gélatine ou sur agar glycérimé, et, qu'après quelque temps d'étuve, on enlève avec un fil de platine recourbé en anse, les colonies qui se sont développées, la surface ainsi ratissée ne verra apparaître aucune nouvelle colonie, si l'on vient à ensemencer de nouveau ce milieu avec du bacille d'Eberth. Il y a une sorte de vaccination.

A peu près à la même époque, M. *Garré* (14) et M. *de Freudenreich* (19) démontrèrent que les milieux solides ou liquides, ayant servi à la culture de certaines bactéries, devenaient complètement impropres à servir de milieu de culture, soit à elles-mêmes, soit à d'autres espèces. Il y avait entre ces espèces un antagonisme frappant. Il semble dans ces cas qu'il y ait immunisation du milieu de culture.

A. — GÉLATINE OU GÉLOSE VACCINÉE.

Dans une communication faite en 1891 à la *Société de Biologie*, M. *Wurtz* (45) trouva dans les faits exposés plus haut, un nouveau caractère différentiel entre le bacille d'Eberth et *B. Coli* communis. En effet, si on ensemence un échantillon de *Coli* sur de la gélose où a déjà poussé un Eberth, le *Coli* s'y développe de façon très appréciable quoique moins bien que sur un milieu neuf. Si, au contraire, on ensemence de l'Eberth sur un tube où aurait végété auparavant un bacille *Coli*, on ne voit pas apparaître de colonie. M. *Wurtz* songe à ce propos que la production d'ammoniaque dans les cultures, doit jouer un rôle assez important dans la production de ce phénomène.

Nous n'avons pu, malgré notre désir, entreprendre

quelques expériences de contrôle au sujet des milieux solides vaccinés. Aussi, nous bornerons-nous à dire que leurs avantages et leurs inconvénients doivent être sensiblement les mêmes que ceux des milieux liquides que nous nous proposons d'examiner tout à l'heure. Nous songeons cependant que les milieux solides sont légèrement inférieurs aux milieux liquides, au point de vue de la précocité du diagnostic. Il est toujours en effet plus difficile de reconnaître qu'une gélose ou une gélatine est fertile que de faire la même constatation pour un bouillon : le moindre louche est ici une réponse facile à interpréter.

B. — BOUILLON SIMPLE

La culture du bacille d'Eberth en milieu solide vacciné, tout comme d'ailleurs, celle du bacille Coli, offrant en plus de leur faible valeur diagnostique, l'inconvénient de ne donner que des colonies assez faiblement appréciables, on a songé à appliquer le principe de la vaccination des milieux, à des liquides nutritifs.

Dès lors, deux choses étaient possibles : ou bien, vacciner le bouillon peptone ordinaire d'usage courant, ou bien vacciner des bouillons spéciaux. D'autre part ce bouillon pouvait être vacciné, soit par la pululation préalable des bacilles vaccinants, soit, par l'addition d'une substance vaccinante. M. *U. Biffi* (210), proposa ainsi de rendre bactéricide pour le Coli communis, du bouillon ordinaire, par l'addition de sérum de lapin immunisé contre ce microbe. M. *H. Emery* (192) proposa lui, de vacciner par culture un

bouillon spécial. Nous n'avons pu trouver d'études portant sur la vaccination du bouillon simple. Cependant, à titre de simple renseignement, nous avons cru devoir combler cette lacune et nous avons désiré savoir ce qui se passe dans les cas de bouillon peptone ordinaire.

Nous avons donc préparé différents bouillons, vaccinés avec diverses races de *Coli* et d'Eberth, et dont l'ensemencement vaccinal, datait d'époques diverses. Nous nous sommes trouvés en présence des bouillons suivants :

Bouillon-vaccin *Coli R*²
Bouillon-vaccin *Coli N.* et *Cl.*
Bouillon-vaccin *Coli Cl.*
Bouillon-vaccin *Eberth. Lab.*
Bouillon-vaccin *Eberth. Jui.*

Nous avonsensemencé ces différents bouillons avec les espèces suivantes :

Eb. Lab., *Eb. Dup.*, *Eb. Jui.*, *Eb. Ver.*, *Coli N.*, *Coli R*², *Coli Cl.*, *Choli Ch.*, *Cholera*, *B. anthr.*, *Mesentericus*, *Staphylococcus*, *B. vert de l'eau*, *B. prodigiosus*, *B. subtilis*.

Voici les résultats de ces ensemencements :

1° *B. Vaccin Coli R*²

En 12 heures, tous les Eberth avaient poussé ; de même les *Coli* sauf le *Coli Ch.*

En 48 heures, le *Coli Ch.* avait également poussé.

N. B. — Notons une fois pour toutes que la pullula-

tion des autres espèces microbiennes n'était nullement entravée, fait qui d'ailleurs, est absolument rationnel et facile à prévoir.

2° *B. Vaccin, Coli N et Cl.*

En 12 heures, tous les tubes ont poussé.

3° *B. Vaccin Coli Cl.*

En 12 heures, tous les tubes ont poussé.

4° *Vaccin Eberth Lab.*

En 12 heures, tous les tubes ont poussé.

5° *B. Vaccin Eberth Jui.*

En 12 heures, tous les tubes ont poussé : cependant les tubes Eb. Lab et Eb. Jui. ne sont que faiblement troublés : ce trouble a d'ailleurs augmenté notablement à la 18^e heure.

Comme à l'époque où nous faisons ces expériences, nous expérimentions le bouillon arsenical de MM. *Brouardel et Thoinot* (157) et que certains Eberth avaient poussé dans ce milieu, nous avons essayé de pratiquer la vaccination de ce bouillon, dans l'espoir de le rendre ainsi plus impropre à la culture de l'Eberth et nous avons eu les bouillons :

B. vaccin arsenical, *Eb. Dup.*

B. vaccin arsenical, *Coli R^s.*

Dont voici les résultats.

1° *B. Vaccin Eb. Dup.*

En 12 heures, tous les Coli ont poussé : aucun Eberth n'a poussé.

En 10 heures, le Eb. Lab et Eb. Ver. ont poussé.

En 24 heures, mêmes résultats.

En 36 heures, tous les Eberth ont poussé.

2° *B. Vaccin Coli R*³.

Parmi les Eberth et les Coli. En 12 heures, seul le Coli Cl a poussé.

En 18 heures, les Coli N, Cl, Ch ont poussé; de même les Eberth, Dup, Jui, Ver.

En 24 heures, tous les Eb. ont poussé, sauf le Eb. Lab.

En 36 heures, tous les Eb. et tous les Coli ont poussé.

Tels sont les résultats que nous avons obtenus dans ces quelques expériences. Il ne nous sied pas d'en tirer des conclusions fermes; cependant nous nous croyons fondé à dire que :

1° En bouillon ordinaire, après vaccination, par culture, la pullulation des microbes n'est entravée en aucune façon; pas plus si le bouillon est Eberthien que s'il est Colien.

2° En bouillon arsenical, vacciné contre l'Eberth, l'Eberth ne pousse jamais avant 18 heures de culture.

Nous ne saurions cependant tirer de là une conclusion ferme, car, vu notre peu d'expérience, elle pourrait être prématurée; nous nous bornons aussi à la simple constatation du fait sans vouloir l'interpréter.

C. — BOUILLON DE RATE

Dans un but analogue, M. H. Emery (192) fait porter ses expériences sur un milieu spécial : « Je fais digérer, » dit-il, de la pulpe de rate de bœuf (200 grammes), par « de l'estomac de porc (250 gr.) dans 1 litre 1/2 d'eau

« acidulée (15 centimètres cubes HCl), en maintenant
« le ballon à l'étuve (50° centigrades), pendant
« 24 heures. J'ajoute ensuite de la macération de pulpe
« de rate (500 grammes pour 1 litre d'eau, faire bouil-
« lir 10 minutes et filtrer sur coton hydrophile mouillé)
« et j'ai ainsi un bouillon dans lequel le bacille typhique
« se développe abondamment en donnant un voile
« épais après quarante-huit heures. Je maintiens à 38°
« centigrades pendant un mois et je stérilise par fil-
« tration; le liquide est très limpide. Si l'on y ense-
« mence du bacille Coli, le trouble apparaît dès la
« sixième heure, tandis que la limpidité se maintient
« au moins pendant quarante-huit heures si c'est du
« bacille d'Eberth. Quelquefois il faut comparer avec
« un tube témoin pour constater un léger trouble. On
« peut être renseigné rapidement en ajoutant au bouil-
« lon de la teinture de tournesol que le B. Coli fait
« virer au rouge..... J'ai expérimenté avec quinze
« variétés de Colibacille et six espèces de bacille ty-
« phique : la réaction a toujours été très nette. »

Tel est le moyen que préconise M. H. Emery pour obtenir un milieu électif et purement propre au bacille Coli. Sa conclusion est que le bacille Coli pousse en six heures, tandis que l'Eberth met quarante-huit heures à pousser.

Nous avons constaté que dans tous les cas, soit que nous ayons eu affaire à du bouillon Coli ou à du bouillon Eberth, nous avons toujours vu une culture assez intense se produire au plus tard à la douzième heure, que d'ailleurs nous ayons ensemencé le microbe vaccinant lui-même ou un de ses semblables. Nous avons

du reste, pour ces quelques expériences, suivi exactement la même marche que pour les expériences que nous avons tentées sur le bouillon peptone ordinaire et nos ensemencements ont toujours été pratiqués avec les quinze espèces microbiennes que nous avons énumérées plus haut.

D. — SERUM

Un autre procédé de vaccination des milieux pour les rendre électifs et différentiels est celui de M. *Biffi* (187) que nous avons signalé quelques pages plus haut. Il consiste à additionner d'une certaine quantité de serum immunisé le bouillon peptone ordinaire : on peut, par exemple, mélanger à un demi-litre de bouillon stérile ordinaire un demi-litre de sérum d'animal immunisé contre le Coli ou contre l'Eberth par les procédés ordinaires. Il reste bien entendu que ce sérum, recueilli aseptiquement, devra être filtré sans bougie, pour que seule la partie liquide soit mélangée au bouillon d'épreuve.

Nous ne reprendrons pas à propos de ce procédé le reproche que nous adressions tout à l'heure aux méthodes précédentes. Il reste de toute évidence que ce qu'il importe de savoir, c'est si nous nous trouvons en présence du bacille d'Eberth. Or, ce bacille d'Eberth devrait théoriquement être le bacille qui poussera sur le bouillon serum coli. Et nos expériences précédentes qui, il est vrai, ne s'appliquent qu'aux toxines microbiennes et non aux antitoxines, nous ont montré que tel Coli était quelquefois seulement spécifique et vaccinant contre lui-même, mais jamais pour les autres,

même de réactions identiques. Dès lors, si plusieurs Coli peuvent fort bien pousser sur un tel milieu, ce milieu ne sera plus différentiel et les microorganismes qui pourront y pulluler auront le droit d'être tout si ce n'est, peut-être, le Coli vaccinant lui-même. Comme le dit M. Ch. Lesieur (226), cette modification est inacceptable a priori. Les Colibacilles appartiennent à des variétés trop nombreuses et trop différentes l'une de l'autre pour qu'un même serum puisse être bactéricide vis-à-vis de toutes, et, par conséquent, n'en laisse végéter aucune.

On peut objecter que le bacille d'Eberth sera bien plutôt celui qui ne poussera pas ou poussera très difficilement sur le bouillon serum Eberth. Et nous répondons encore que là même le phénomène d'agglutination intervenant, tout bacille qui poussera pourra très bien être un Eberth, par la seule raison que certains Eberth, d'ailleurs très authentiques, sont à peine agglutinables et même quelquefois ne peuvent être agglutinables qu'après passage en péritoine de cobaye ou ensemencements nombreux ayant pour but d'exalter leurs propriétés. D'ailleurs serait-il vraiment facile de constater l'identité d'un bacille d'Eberth par la culture en bouillon-serum-Eberth? Puisque la caractéristique du bacille d'Eberth consisterait à ne pas pousser du tout, ou tout au moins, très peu, ce sera dès lors le bacille qui poussera dans le temps le plus long qui sera le bacille typhique.

Il ne nous est pas permis cependant de condamner une méthode d'expérimentation sans l'avoir contrôlée nous-même; et comme nous n'avons pu pratiquer ces

expériences de contrôle, nous nous bornerons à émettre l'opinion que les bouillons-sérum ou les bouillons vaccin ne sont pas appelés à rendre de bien grands services. S'il en est un qui peut-être doive être retenu comme susceptible d'aider fructueusement les recherches bactériologiques, nous serons portés à accorder une certaine valeur à la vaccination préventive du bouillon arsenical de MM. Brouardel et Thoinot par l'ensemencement d'un bacille d'Eberth authentique. Et si notre opinion est telle, quoiqu'en contradiction avec les expériences de ces derniers auteurs, c'est que le bouillon à l'acide arsenieux a toujours, du moins pour nous, été fertile pour le bacille typhique. Il le fut peu, c'est vrai, mais il le fut.

CHAPITRE V

Méthode de Cambier

Un tout autre point de vue a servi de point de départ à M. R. Cambier, lorsqu'il créa sa méthode d'isolement des bacilles typhiques et coli communis. Dans une communication à l'*Académie des sciences*, M. R. Cambier (190) faisait connaître un nouveau procédé de séparation de l'Eberth et du Coli, basé sur les propriétés des bougies filtrantes en porcelaine poreuse et sur la facilité avec laquelle le bacille d'Eberth peut en traverser les parois.

En supposant une eau suspecte, ensemencée en bouil-

lon, dans la cavité d'une bougie Chamberland (marque F), placée elle-même dans un large tube de bouillon nutritif, le liquide extérieur ne se troublera en 24 ou 36 heures, d'après l'auteur du procédé. que si l'eau contient du bacille typhique.

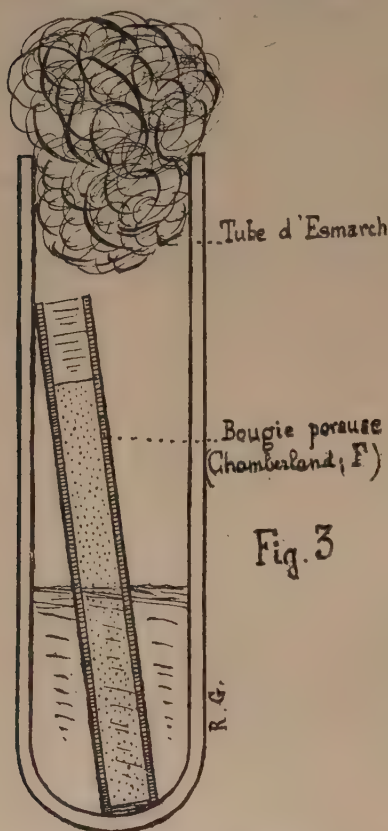


Fig. 3

Fig. 3. — MÉTHODE DE CAMBIER (Schéma)

À la suite de ces expériences M. Cambier reprit ses recherches et constata qu'il avait été trop loin dans ses assertions. Il modifia alors sa technique et cherchant la formule d'un milieu favorable au bacille d'Eberth et défavorable

M. Biffi, cherchant à vérifier l'exactitude de ce procédé de séparation, fut amené à l'infirmer ou du moins à en modifier la technique. Il constata que le bacille Coli, en bouillon ordinaire (peptoné et salé), passe à travers les parois des bougies poreuses, aussi vite et aussi souvent que le bacille d'Eberth. Pour obvier à cet inconvénient, il proposa de vacciner le bouillon d'épreuve contre le colibacille. Nous ne reviendrons pas sur cette question déjà envisagée.

au bacille Coli, il s'arrête à la formule suivante :

Solution aq. peptone Defresne 3 %.... 1000

— soude caustique 1 %.... 80-120

— saturée à froid de NaCl... 80-120

(Mélanger à froid après stérilisation préalable à 115°).

C'est avec ce mélange nutritif qu'il reprit la série de ses expériences.

C'est à cette époque que se placent les expériences de contrôle entreprises au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon par le Docteur *Ch. Lesieur* (226).

Ces expériences ont abouti à restreindre la valeur du procédé de Cambier, comme moyen d'isolement de l'Eberth. Voici en effet quelles en ont été les conclusions :

1° Le bacille d'Eberth traverse toujours les parois des bougies Chamberland (marque F), sa vitesse est d'ailleurs variable de 2 à 7 jours.

2° Le bacille Coli communis traverse souvent (6 fois sur 8 expériences), les mêmes bougies et presque dans le même temps.

3° En mélange, le B. d'Eberth et le B. Coli traversent souvent (9 fois sur 12), les parois des bougies filtrantes. La culture extérieure n'est jamais exempte de colibacilles.

A la suite de ses recherches et pour les compléter, nous avons voulu examiner la valeur de la réaction de Cambier, suivant que l'on soumettait les cultures à la température de 37° ou à celle de 44°5.

Nous avons doncensemencé simultanément à ces

deux températures, les Coli Lan. et From. ainsi que les Eberth Ver. et Rom. Voici les résultats que nous avons obtenus :

1° A 37° en 12 heures, le Coli Lan. a traversé les parois de la bougie.

En 24 heures, le résultat reste le même.

En 36 heures, l'Eberth Ver. a traversé les parois de la bougie.

En 48 heures, l'Eberth Rom. n'a pas encore poussé.

2° A 44°, en 12 heures, pas de culture extérieure.

En 24 heures, pas de culture extérieure.

En 36 heures, les Coli Lan. Eberth Ver. et Eberth Rom. ont traversé la bougie.

En 48 heures, le Coli From. n'a pas encore poussé.

D'autre part nous avons établi une autre série d'expériences pour connaître la valeur comparative des bouillons peptone ordinaire, de rate d'Emery, sodé de Cambier, au point de vue de la facilité avec laquelle le bacille d'Eberth y pullule.

Ces expériences ou nous avonsensemencé tantôt des cultures ordinaires, tantôt du sang de typhique, déjà reconnu comme contenant du bacille d'Eberth, nous ont amené à formuler les conclusions suivantes :

1° Que le bacille d'Eberth provienne de sang de typhique ou de cultures entretenues, la valeur relative des milieux reste la même.

2° La température influe sur la pullulation mais bien moins en milieu de Cambier qu'en bouillon de rate ou en bouillon ordinaire.

3° Le bacille d'Eberth a toujours poussé en un temps moyen de 20 à 24 heures, en milieu de Cambier

tandis qu'il faut un temps moyen de 48 heures avec le bouillon ordinaire.

4° Le bouillon de rate demande une incubation variant de 2 jours à 8 jours ou davantage avant de présenter un trouble indiquant la présence du bacille dans son intérieur.

Des trois séries d'expériences qui précèdent nous concluons donc que :

1° Comme moyen diagnostic entre l'Eberth et le Coli, le procédé de Cambier est très délicat mais pêche justement par le peu de différence qui existe entre la manière dont se conduisent les deux bacilles.

2° Il n'y a aucun inconvénient, en ce qui concerne le bacille d'Eberth, à le soumettre en tubes de Cambier, à la température dysgénésique de 44°5. La mobilité des bacilles ne semble pas en effet être fâcheusement influencée par l'action de cette température élevée.

3° Le milieu de Cambier gardera toute sa valeur, si, de parti pris, et d'une manière régulière on ensemine en bouillon peptone ordinaire neutre, le liquide extérieur, qu'on y remarque d'ailleurs un trouble ou qu'on n'en remarque pas.

4° Comme milieux électifs, la valeur des bouillons de Cambier, de rate, ou peptoné ordinaire, est par ordre de décroissance :

- a) Bouillon sodé de Cambier ;
 - b) Bouillon peptone ordinaire ;
 - c) Bouillon de rate.
-

QUATRIÈME PARTIE

Identification de l'Eberth et du Coli.

Il nous reste maintenant à voir au moyen de quels caractères nous pouvons distinguer le colibacille et le bacille typhique, c'est-à-dire, comment nous pourrions après avoir isolé un bacille par les méthodes que nous avons examinées précédemment, dire de ce bacille : c'est un Coli, ou bien c'est un Eberth.

Nous allons examiner la valeur des différents caractères susceptibles de faire porter ce diagnostic. Nous allons successivement passer en revue les cultures sur milieux solides, les cultures en milieux liquides, puis en dernier lieu nous nous occuperons des réactions de l'indol et de l'agglutination.

CHAPITRE PREMIER

Culture sur milieux solides.

A. — CULTURE SUR POMME DE TERRE.

Les cultures sur pomme de terre, nous l'avons déjà dit, ont été pendant très longtemps considérées comme caractéristiques, et constituaient un des meilleurs moyens de différenciation. Malheureusement, ce caractère n'est pas aussi constant qu'on aurait voulu le croire, et tels échantillons du *B. Coli* semblent être du *Bacille d'Eberth* et inversement.

Sur pomme de terre, un *Eberth* authentique, type, n'est visible à l'état de culture qu'au bout d'environ deux jours d'étuve ; et ce n'est même qu'en examinant à jour frisant la surfaceensemencée, que l'on aperçoit une trainée luisante, humide et vernissée, rappelant les traces du passage d'une limace ou d'un escargot ; la culture est en « bave d'escargot ». Mais, avec le temps, il arrive assez souvent que la colonie devient très visible et même quelquefois qu'elle se colore en jaune légèrement brunâtre.

Büchner (18) croit que pour obtenir directement de ces cultures typhiques anormales, il suffit de rendre les pommes de terre très alcalines, en les faisant macérer assez longtemps avant leur mise en tube, dans une solution légère de carbonate de soude.

Le Bacille Coli, lui, se développe d'ordinaire très abondamment sur pomme de terre, et, au bout de vingt-quatre heures, on se trouve en présence d'une culture déjà assez épaisse. C'est alors un enduit visqueux et luisant, coloré au début en jaune clair, et passant rapidement à l'aspect de « purée de pois ». Toutefois, certaines cultures présentent l'aspect d'un enduit à peine apparent, humide, incolore, rappelant la culture du bacille typhique.

M. *Peré* (53) croit pouvoir attribuer l'origine de ces différences à l'âge et à la variété de la pomme de terre. D'après lui, les besoins de la plante influeraient sur la composition quantitative et qualitative du tubercule, chose d'ailleurs fort logique, et, comme dès lors le milieu est variable, les cultures peuvent en revêtir des aspects très différents. Ainsi, ensemencé sur la variété de pomme de terre dite de « de Hollande », le Colibacille peut donner assez fréquemment des cultures peu visibles, en « bave d'escargots » ; sur le tubercule avorté, une culture rapide, épaisse et verdâtre : sur la pomme de terre ordinaire, une culture jaunâtre.

Des expériences que nous avons faites à ce sujet, nous conclurons à notre tour aux faits suivants :

Sur pomme de terre simple, en 2 jours, les résultats sont assez souvent ceux que l'on est en droit d'espérer. Passé ce délai, les colonies évoluent dans des sens très différents. — D'autres espèces d'ailleurs affectent l'apparence d'espèces éberthiennes ou coliennes ; nous citerons ainsi le *Vibrien cholérique*, et le *B. prodigiosus*.

Sur pomme de terre glycélinée, nous avons eu cons-

tamment, et pour les mêmes bacilles, les résultats les plus variables, suivant l'âge de la culture, la race du bacille, et sans pouvoir cependant en conclure à un déterminisme quelconque.

Si nous considérons donc en même temps que les résultats obtenus par les auteurs qui nous ont précédé, ceux que nous avons nous-même constatés, il devient véritablement difficile d'attribuer une bien grande valeur diagnostique aux caractères d'aspect et de coloration que peuvent présenter les cultures coliennes ou éberthiennes sur pomme de terre. Ce n'est pas à dire que nous refusions toute valeur à la constatation de pareils faits; mais nous pensons purement et simplement que l'importance de ce genre de constatations est tout au moins d'ordre secondaire, et qu'il est plus équitable de ne leur accorder qu'une valeur de simple probabilité.

B. — CULTURE SUR ARTICHAUT.

Il y a quelques années, M. Roger (154) faisait connaître dans les *Mémoires de la Société de Biologie*, que l'artichaut pouvait servir de milieu de culture pour certains microbes, et que, de plus, il pouvait être utilisé pour le diagnostic bactériologique.

Voici comment doit être préparé ce milieu :

Après avoir enlevé les bractées de l'artichaut, on coupe le réceptacle en petits cubes en ayant soin de conserver le foin qui le surmonte. On introduit les morceaux dans des tubes dont l'extrémité inférieure est garnie avec de l'ouate humide. On place, naturel-

lement, le foin en haut, de telle sorte que le milieu de culture est représenté par une masse charnue surmontée d'une espèce d'aigrette. Puis, après avoir bouilli avec de l'ouate, on chauffe à l'autoclave à 115°, pendant un quart d'heure. Quand on fait l'ensemencement, il faut avoir soin de déposer les germes au point où se fait l'insertion des fleurs.

Mis en culture sur un pareil milieu, les microbes se divisent d'eux-mêmes en deux groupes, suivant qu'ils laissent ou non à l'artichaut sa coloration primitive. Les uns lui laissent la couleur gris cendré que lui a donné la stérilisation; les autres, au contraire, lui font prendre une coloration vert foncé, très intense, presque noire. Le bacille typhique appartient, d'après M. Roger, au premier groupe; le bacille Coli au second.

Il est très certain que ces deux bactéries se comportent très différemment, au moins au point de vue de la rapidité de leur pullulation. Le bacille typhique donne des colonies très peu apparentes, quelle que soit l'ancienneté de la culture, tandis qu'en vingt-quatre heures, on voit apparaître une coloration vert foncé, qui s'étend sur tout le petit cube d'artichaut, et qui a même coloré par égouttement, l'ouate humide placée au fond du tube si c'est du B. Coli.

Quelle est la cause de ce changement de couleur, de cette pigmentation de l'artichaut; ceci ne rentre pas dans le cadre de nos expériences.

M. G. Roux (143), songe que le bacille Coli secrète une oxydase dont l'action se traduirait par cette

pigmentation : d'après lui, les mêmes phénomènes se produiraient en présence du cardon, végétal analogue à l'artichaut.

Nous avons également essayé la valeur de cette réaction. Après avoirensemencé plusieurs fois de suite différents bacilles et après avoir constaté la variabilité de cette réaction, nous ne pouvons mieux faire que de donner la moyenne des résultats que nous avons obtenus :

En 24 heures, ont donné une réaction colienne :

Coli R.

Coli Cl.

Eb. We.

Eb. Bou.

Les deux derniers microbes, *Eb. We.*, et *Eb. Bou.*, reportés directement de l'artichaut en bouillon au tournesol et au rouge-neutre, nous ont constamment donné la réaction des Eberth authentiques.

En 3 jours : réaction colienne ; nouvel ensemencement :

Coli R.

Coli Cl.

Coli R.

Eb. We.

Eb. Bou.

B. mesentericus...

Le *Choléra*, l'*Eb. Dup.* et l'*Eb. Lab.* nous ont toujours donné une réaction éberthiforme.

Devant de tels résultats, nous croyons prudent de

nous tenir sur la réserve, et de ne pas accorder plus de créance à la culture sur artichaut qu'à la culture sur pomme de terre. Nous aurions dû, pour vider la question, étudier complètement les variations du pouvoir zymotique de ces bacilles ; mais ceci ne rentrait pas dans le cadre que nous nous étions fixés : nous ne visons pas à l'interprétation des causes, nous ne cherchons que la constation des faits.

Nous aurions dû placer ici, les milieux différentiels semi-solides, tels que la gélose de *Grünbaum et Hume*, et la gélatine d'*Elsner*. Mais cette étude est déjà faite, et pour éviter des redites, nous passerons de suite à l'étude des milieux liquides.

CHAPITRE II

Milieux liquides

A. — CULTURE DANS LE LAIT

Si l'on ensemence du *B. Coli* dans du lait stérilisé, on voit, ordinairement, au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures d'étuve, que le lait est coagulé. Le lactose, étant attaqué par le bacille *Coli*, met en liberté des acides qui déterminent en peu de temps la coagulation de la caséine. Dans les tubes, on voit à la partie inférieure, un coagulum, au-dessus duquel surnage un liquide jaunâtre, transparent, à réaction souvent acide.

Le bacille typhique ensemencé dans le lait, y pousse abondamment à la température de 37°, mais il n'apporte aucun changement visible dans la constitution du milieu. Le lait n'est pas coagulé, même après un très long séjour à l'étuve.

Mais malheureusement, les choses ne se passent pas toujours ainsi. Les preuves abondent : les communications sont nombreuses à ce sujet ; en passant seulement, nous pouvons citer MM. *Dubief, Rodet et Roux, Gilbert et Lion, Miasnikoff, Etienne* (67), *Ramond* (112), *Lapierre* (200) ; ces auteurs ont tous apporté des faits négatifs nombreux au sujet de la coagulation du lait par le colibacille.

Nos expériences personnelles tendent aux mêmes conclusions. Tantôt, et peu souvent, coagulation en 2 jours ; souvent, coagulation très lente, ne se produisant qu'en 10, 15, et même 20 jours : assez souvent enfin, nous n'avons pas pu obtenir la coagulation du lait. Et cependant, par ailleurs, les caractères de nos bacilles étaient tout à fait suffisants à les faire reconnaître comme des *Coli* types.

Que conclure de là ? En présence d'un bacille qui coagule la caséine du lait, on peut affirmer qu'il ne s'agit pas du bacille d'Eberth, la chose est aujourd'hui reconnue ; mais l'absence de coagulation ne prouve pas qu'on soit en présence de ce microbe, puisqu'on connaît actuellement l'existence d'un certain nombre de colibacilles qui ne coagulent jamais le lait.

Généralement, tout colibacille qui produit une fermentation intense de la lactose, coagule le lait, et ceux qui ne produisent qu'une fermentation légère ne le

coagulent pas. M. *Gautié* (160) rapporte avoir trouvé 4 échantillons de *Coli* qui se conduisaient ainsi en présence du lait. Mais, d'après M. *Refick* (113), il n'y aurait aucun rapport forcé entre la fermentation de la lactose et la coagulation du lait, cet expérimentateur ayant trouvé dans les eaux de Constantinople des échantillons de *Coli* qui ne font fermenter ni le lactose, ni le glucose, mais qui pourtant coagulent le lait.

En somme, le signe de la coagulation ou de la non coagulation du lait ne peut avoir de valeur que s'il est associé à plusieurs autres caractères différentiels.

B. — BOUILLON LACTOSÉ TOURNESOLÉ

C'est une conséquence toute naturelle de ce dégagement de corps acides, que d'avoir voulu le déceler par des moyens autres que la coagulation de la caséine du lait.

C'est là la caractéristique des bouillons lactosés, dans lesquels on décèle la présence des acides provenant de la décomposition du lactose, au moyen de différents réactifs de coloration.

M. *Wurtz* (45) proposa donc l'emploi d'un bouillon lactosé, dans lequel le réactif indicateur est la teinture sensible de tournesol. Voici le manuel opératoire qu'il indique pour la préparation de ce milieu :

On stérilise à 120° les tubes de bouillon ou d'eau peptone lactosés à 2 p. 100, et on les additionne de teinture de tournesol stérilisée en quantité suffisante, pour produire dans ce liquide une coloration violet-améthyste.

Dans un tel milieu, le bacille coli donne une coloration rouge lie de vin, avec dégagement de petites bulles gazeuses si on a soin de laisser le liquide au repos, tandis que le bacille typhique ne produit pas de gaz et ne fait pas virer la teinture de tournesol.

Il arrive quelquefois que les tubesensemencés avec du bacille d'Eberth, se décolorent entièrement au bout de vingt-quatre heures d'étuve, et il ne reste alors qu'une collerette bleue à la surface du liquide. M. Wurtz pense qu'il s'agit là d'un phénomène de réduction dû à la production d'hydrogène naissant. La solution de tournesol, rendue alcaline par une certaine quantité d'ammoniaque que dégage le bacille d'Eberth, serait décolorée par cet hydrogène naissant. Le même fait pourrait d'ailleurs s'observer pour les tubesensemencés avec du bacille d'Escherich.

On a adressé au procédé au tournesol de nombreuses critiques. La plus importante consiste surtout en ce qu'il est utile qu'il y ait une quantité notable d'acide mis en liberté pour que le tournesol vire au rouge. Souvent le liquide violet n'est que décoloré, et la coloration rose ou rouge n'apparaît qu'après une agitation énergique du tube et un séjour prolongé à l'air.

On peut de même adresser à ce procédé de diagnostic le reproche de n'être pas un procédé à résultat constant. Puisque le virage du tournesol est la conséquence de la décomposition du lactose, il est certain que les variétés de Coli qui ne le font pas fermenter, donneront en bouillon tournesolé une réaction négative. C'est ce qui ressort des faits rapportés par MM. *Refick* (113) et *Lapierre* (200), entre autres.

C'est pour essayer de remédier au premier de ces inconvénients, le second ne pouvant être évité, que l'on a imaginé de remplacer le tournesol par d'autres réactifs indicateurs plus sensibles. L'examen des procédés à la *rubine acide* de Ramond (112), à la *phtaléine du phénol* de Mérieux et Carré (151), à la *fluorescéine* de Graziani (130), et au *bleu soluble* de Robin (141), est consigné dans la thèse de M. Gautié (160). Les conclusions de cet auteur sont que les procédés au tournesol et à la rubine acide sont encore les meilleurs. Les trois autres procédés, de valeur plus faible, sont entre eux à peu près équivalents, et n'offrent d'ailleurs aucune espèce d'avantages.

Dans le cours de nos expériences, nous avons nous-mêmes expérimenté sur la *phénolphtaléine* et sur le *Krystall-violett* de Hochst (1). Nos résultats concordent absolument avec ceux de M. Gautié en ce qui concerne la phtaléine du phénol ; pour le Krystall-violett, (nous ne sachons pas qu'il ait été employé dans ces cas), nous ne lui accordons pas plus de valeur qu'à la phtaléine.

Nous concluerons donc de même que M. Gautié, en reconnaissant comme le meilleur de ces réactifs, la teinture sensible de tournesol, en solution lactosée.

(1) Le Krystall-violett de Hochst, violet en solution neutre ou alcaline devient bleu en solution faiblement acide, puis vert émeraude, si l'acidité augmente. La neutralisation de la solution fait repasser le réactif colorant par les mêmes nuances. Trop d'acidité décolore complètement le milieu, en détruisant la matière colorante.

C. — BOUILLON AU ROUGE-NEUTRE

En 1898, *Rothberger* (155) découvre que le *B. Coli* réduit une solution de *Rouge-Neutre* ⁽¹⁾ la couleur de ce milieu passant au jaune canari, avec une *fluorescence verte*, de rose-rouge qu'il était auparavant; le *B. d'Eberth* n'en agirait pas de même : d'où un moyen de diagnostic différentiel entre ces deux organismes.

Scheffler (184) confirma les données de Rothberger en étendant ses recherches à de nombreuses races de *Coli*. *Hunter* (199) a obtenu aussi des résultats identiques. Il est cependant bon de remarquer que d'autres microorganismes possèdent la même propriété : *B. enteritidis*, *B. tetani*, *B. anthracis symptomatici*, *B. œdematis maligni*...

Méthode de Makgill-Savage

Au mois d'août et d'octobre 1901, MM. *W. G. Savage* (206) et *R. H. Makgill* (202) faisaient connaître le résultat de leurs recherches, sur le point de savoir la valeur exacte de la réaction du rouge-neutre, dite de Rothberger, pour le diagnostic différentiel et de présence dans les eaux de boisson du bacille d'Eberth-Gaffky et du bacille d'Escherich. Nous croyons utile de rappeler les conclusions de ces auteurs.

W. G. Savage (206) termine sa communication au 69^e Congrès annuel de la *British medical Association*, par l'exposé des conclusions suivantes :

(1) Le rouge-neutre ou rouge de *toluylène*, est désigné en chimie sous le nom de *diméthylidiamidotoluphénazine*.

1° Une réaction positive, obtenue malgré l'absence du diagnostic certain du *Bacillus Coli Communis*, est cependant dans la majorité des cas, l'indice de la présence de ce microorganisme.

2° Une réaction négative rend la présence du *Bacillus Coli Communis* très hautement improbable.

3° Cette méthode est d'un emploi très facile et il suffit d'une attention raisonnable pour éviter les causes d'erreur dans son application.

4° La réaction du rouge-neutre est d'une grande valeur au point de vue de l'analyse habituelle des eaux, concernant la présence du *Bacillus Coli communis*.

Le Dr R. H. Makgill (202) expose, lui, les résultats suivants :

1° La réaction du Rouge neutre apporte une preuve rapide et délicate de la présence du bacille d'Escherich dans l'eau;

2° En utilisant différentes quantités d'eau, et en éliminant les causes d'erreurs dues à d'autres microorganismes, on peut évaluer la teneur de l'eau en *B. Coli*;

3° Un résultat négatif peut être envisagé comme signe évident de l'absence du *Bacille Coli*;

4° Des recherches ultérieures sont utiles pour savoir si, oui ou non, une réaction positive indique toujours la présence du *B. Coli*. Jusqu'à présent, l'auteur n'a pas observé un seul cas où l'échantillon d'eau ne contenant pas le *B. Coli* ait donné une réaction positive.

En résumé, ces deux auteurs sont d'accord sur les points suivants :

1° Une réaction positive indique la présence du *B. Coli*;

2° Un résultat négatif est presque une preuve de l'absence de ce microorganisme.

Il est à remarquer que ces auteurs semblent s'être préoccupés surtout de voir l'action du B. Coli sur le rouge neutre, et qu'ils ont complètement laissé dans l'ombre la question de savoir comment se comporteraient d'une part le B. d'Eberth ou le B. Coli isolés, et d'autre part, les mêmes bacilles mélangés. C'est en effet à l'état de mélange que ces microorganismes se présentent à nous le plus souvent dans l'eau.

Pour examiner la valeur de cette méthode, nous avons supposé logiquement, que, si elle était bonne en face d'eaux contaminées, elle ne saurait être autrement en face de cultures pures ou impures, c'est-à-dire, de mélanges de B. d'Eberth et de B. Coli. Notre milieu d'expérimentation a été le bouillon dont W. G. Savage (206) nous donne la formule :

Dans un demi-litre d'eau, on fait cuire 125 grammes de viande de bœuf ; après cuisson et refroidissement, on ajoute :

Peptone Dufresne	40 gr.
Sel marin.....	10 gr.
Glucose	2 gr. 50

et l'on ramène à 500 cent. cubes avec de l'eau On fait bouillir de nouveau ; puis après refroidissement et repos, on décante avec précaution, puis on ajoute 5 cent. cubes de la solution suivante :

Neutral-Roth	5 gr.
Eau distillée	400 gr.

On porte le tout, préalablement mis dans un flacon-réserve, à l'autoclave; et on chauffe à 115 degrés pendant environ 30 minutes.

Puis on place ce flacon dans l'étuve à 37° pour pour l'éprouver, et s'en servir si 48 heures plus tard il est resté stérile.

Nous devons dire que, lorsque, ayantensemencé un Coli ou un mélange d'Eberth et de Coli dans le bouillon au rouge-neutre, nous avons eu une réaction négative, notre premier soin a été d'ensemencer de suite quelques gouttes de ce bouillon qui semblait stérile en bouillon lactosé tournesolé ordinaire.

Pour toutes nos expériences, nous avons conservé nos cultures au moins pendant 72 heures, et nous avons complé comme réaction positive tout changement de couleur appréciable, d'après la comparaison avec un tube témoin.

Nous avons été tout d'abord frappé de voir avec quelle régularité se comporte le bouillon au rouge-neutre selon la formule de W. G. Savage (206), en présence du bacille Coli communis ou du bacille d'Eberth, en culture pure concentrée ou diluée.

Mais la réaction perd ce caractère de régularité lorsque ce sont des mélanges de B. d'Eberth et de B. d'Escherich que nous faisons agir sur le rouge-neutre. Tantôt nous avons un résultat positif après seulement 24 heures de culture, tantôt après 48 heures. tantôt le résultat est complètement négatif, et on ne peut pas dire que, dans ces cas de réaction négative, ce soit la stérilité du bouillon qui soit cause de ce manque de résultat, car nous avons, dans tous ces cas

vérifié la vitalité de ces bouillons en les ensemençant dans du bouillon lactosé tournesolé et en les mettant ensemble et comparativement à l'étuve à 37°. Et dans ces cas, la couleur sensible du tournesol a indiqué presque toujours la présence du bacille Coli, soit en 24 ou 48 heures, ou en trois jours.

Dans le cours de nos expériences, nous avons vu un changement de coloration imprévu se produire dans les 7 cas suivants :

- 1° *Eberth Bou.*, seul,
- 2° *Eberth Mou.*, *Coli Cl.*,
- 3° *Eberth Mou.*, *Coli Mou.*,
- 4° *Eberth Bou.*, *Coli Cl.*,
- 5° *Eberth Bou.*, *Coli Mou.*,
- 6° *Eberth Bou.*, *Coli R.*,
- 7° *Eberth Bou.*, *Coli Mou.*,

Dans ces 7 cas, le milieu de culture a pris une coloration *rouge-carmin*, qu'on ne pouvait confondre avec la couleur dichroïque de Rothberger. Nous avons compté cette réaction comme négative, car, dans l'hypothèse contraire, nous nous serions trouvés en présence d'un bacille d'Eberth authentique, nous donnant en 24 heures la réaction caractéristique du B. Coli. La supposition, que nous faisons ainsi, est, d'ailleurs, toute à l'avantage de la méthode que nous examinions.

Il est cependant à remarquer que ce virage du rouge-neutre au rouge-carmin ne s'est jamais produit qu'en présence du bacille d'Eberth. Nous ne donnons d'ailleurs à cette remarque que l'importance que

mérite une simple constatation. L'étude de cette réaction spéciale aurait été grosse de difficultés et d'imprévus : aussi nous sommes-nous bornés à une simple constatation.

Dans une série de recherches entreprises postérieurement à ces expériences, nous avons été encore plus frappés de la régularité avec laquelle le bouillon au rouge-neutre virait au rouge-carmin, en présence d'un bacille d'Eberth authentique.

Ayant voulu nous faire une opinion sur les modifications qu'une température élevée pourrait apporter à la réaction de Rothberger, nous avonsensemencé concurremment en bouillon rouge-neutre 18 bacilles d'Eberth authentiques, 6 bacilles Coli communis identifiés, et 4 mélanges poussant à 44° 5 et faisant virer au rouge la teinture de tournesol. Voici les résultats de cesensemencements, mis à l'étuve électrique à 44° 5 et à la chambre étuve à 37°.

1° Lorsque la réaction se produit, elle a aussi bien lieu à 44° 5 qu'à 37 ;

2° La réaction se produit presque toujours (7 fois sur 12) dans les 24 heures ;

3° La teinte carminée que nous avons signalée se produit également presque toujours en 24 heures (15 fois sur 18).

La régularité aussi grande de cette teinte carminée, nous paraît pouvoir être considérée au besoin comme un bon signe de la nature éberthienne du microbe en culture.

D'autres espèces de microbes aquat nous ont bien donné également cette réaction ; nous ne pouvons

nous empêcher de signaler ici le fait que le *Vibrio cholerae* se conduit vis-à-vis de ce milieu comme un bacille d'Eberth, c'est-à-dire qu'il ne donne pas la coloration vert dichroïque, mais qu'il fait virer au rouge carmin la teinte dorée du bouillon, tandis que le *Bacillus Mesentericus vulgaris*, semblable en cela au *bacillus enteriditis* de Gaertner, réduit le rouge-neutre en produisant la *fluorescence verte*.

Quels sont donc en résumé, les résultats de nos recherches ? Nous pouvons les grouper sous les trois chefs suivants :

1^o Coli seul. — Le B. coli seul, a toujours réduit le bouillon au rouge-neutre (formule de W. G. Savage); tantôt en 24 heures, tantôt en 48 heures.

2^o Eberth seul. — Le B. d'Eberth seul, ne réduit pas le rouge-neutre à 72 h. de culture ; cependant nous avons noté *une* réaction positive nette.

3^o Mélanges d'Eberth et de Coli. — Les mélanges de Coli et d'Eberth donnent la plupart du temps une réaction positive en 24 heures, presque toujours en 48 heures.

4^o La température à laquelle on fait végéter les microbes n'a aucune importance au point de vue de la production de la réaction de Rothberger.

5^o On pourrait *peut-être* accorder une *certaine* valeur diagnostique à la *teinte carminée* qu'a pris le milieu, chaque fois que nous avons été en présence d'un *bacille d'Eberth*.

6^o Néanmoins, il faut songer toujours que certains bacilles sont vis-à-vis du rouge-neutre coliformes (*B. enteriditis*, *B. Mesentericus*), et certains autres éberthiformes (*Vibrio cholerae*).

D. — BOUILLON ARSENICAL

MM. *Thoinot et G. Brouardel* (157) s'appuyant sur la réaction des microbes vis-à-vis d'un antiseptique donné, comme sur un de leurs caractères biologiques les plus nets, ont tenté d'éprouver la valeur de cette réaction, comme procédé de différenciation des deux bacilles d'Eberth et d'Escherich. Ils ont eu, disent-ils, la confirmation de ce fait, pour ces deux bacilles mis en présence de l'acide arsénieux :

Le bacille d'Eberth ne se développerait pas dans des bouillons peptonisés formant solution d'acide arsénieux à 0 gr. 01 pour 1000. Dans quelques cas exceptionnels on pourrait obtenir un développement faible, mais on serait certain de n'avoir aucune végétation, si on portait le titre arsenical à 0 gr. 015 ou 0.02 p. 1000. De plus le bacille d'Eberth *ne s'entraîne pas*, c'est-à-dire qu'il ne s'habitue pas à l'action de ce toxique, et qu'il ne peut vivre en présence de doses croissantes du poison.

Tout échantillon de coli-bacille pourrait au contraire, d'emblée et sans difficulté, vivre dans des bouillons titrés à 1 gr. 50 p. 1000 d'acide arsénieux : c'est la résistance minima du coli-bacille à ce poison. Mais, de même qu'il existe plusieurs variétés de coli-bacilles, de même se conduisent-ils différemment en présence de ce toxique : jamais tués par 1 pr. 50 p. 1000 d'acide arsénieux, certains d'entre eux supportent d'emblée des doses plus fortes jusqu'à 2 gr. par litre. De plus il est possible de les entraîner, et de les habituer à végéter dans un milieu contenant jusqu'à 3 p. 1000 de poison

C'est de cette manière différente de se comporter vis-à-vis de l'acide arsénieux, que ces auteurs ont voulu faire un caractère de diagnostic différentiel.

Les quelques expériences de contrôle que nous avons faites nous permettent de croire que ce caractère du bacille d'Eberth a été un peu exagéré par MM. Thoinot et Brouardel. Dès vingt-quatre heures de culture à l'étuve soit à 37°, soit à 44° 5, le bouillon arsenical préparé d'après les indications de ces auteurs, laisse nettement entrevoir un trouble. Il est vrai cependant que les cultures de coli sont plus abondants que les cultures d'Eberth ; mais toutefois nous ne considérons pas cette simple différence d'intensité comme un caractère suffisamment précis et reconnaissable, pour permettre de qualifier d'Eberth ou de Coli un bacille, suivant qu'il pousse plus ou moins dans un tel milieu.

Nous noterons en outre, que dans ce même bouillon arsenical, soumis à la température de 44° 5, le vibrion du choléra ne pousse pas, tandis qu'à la température de 37°, sa culture apparaît dans le courant du 2^e jour ; le même fait s'est reproduit à différentes reprises avec le B. prodigiosus de même qu'avec le B. du choléra et le B. anthracis.

Nous croyons donc pouvoir dire que le bouillon arsenical, paraît être un milieu suffisamment électif au point de vue de certains bacilles, comme le B. *prodigiosus* le B. *anthracis*, le *vibrion cholérique*, surtout ensemencés à la température de 44° 5. Quant à sa valeur diagnostique entre le B. Coli communis et le B. d'Eberth, nous ne l'accepterons pas dans le cas de bouillon arsenical simple : nous donnerions plus de

valeur, ainsi que nous l'avons vu dans le courant de cette étude, au même bouillon, préalablement vacciné contre le bacille d'Eberth ensemencé en grande quantité. (*V. vaccination des milieux de culture*).

CHAPITRE III

Réactions chimiques et biologiques

En dehors des caractères que l'on peut retirer des cultures en milieux solides ou liquides, pour la différenciation, il est deux autres réactions qui ont joui d'une certaine faveur pendant assez longtemps, et que l'on croyait absolument spécifiques et certaines. Ce sont la réaction, dite de l'*indol*, et la *séro-réaction*. Nous allons les examiner et essayer de déterminer leur valeur diagnostique.

A. — RÉACTION DE L'INDOL

D'abord étudiée par *Kitasato* (23), qui chercha à en faire un caractère pouvant servir à la diagnose, la *réaction de l'indol* fut étudiée à nouveau par nombre d'auteurs qui la rencontrèrent chez plusieurs espèces microbiennes.

N'attaquant pas, ou presque pas, les matières albuminoïdes, le *B. Coli* a une action tout à fait marquée sur les *syntonines* et les *peptones*. Dans le bouillon

peptoné, il se forme rapidement de l'*indol*. La production est surtout abondante avec la peptone pancréatique, mais s'observe aussi avec les autres peptones.

Après un jour ou deux de culture, au contact de l'air ou à l'abri de l'air, en ajoutant à 10 centimètres cubes de culture, 1 centimètre cube de solution de nitrite de potassium à 2 pour 10.000 et V à VI gouttes d'acide sulfurique au quart, on obtient une coloration rosée ou rouge très nette.

Péré a montré que la réaction ne se produisait pas, au début du moins, lorsque le liquide nutritif contient des sucres; elle ne devient possible qu'à partir du moment où les sucres ont été complètement élaborés.

La production de l'*indol* semble également être entravée par une culture en couche mince, souvent aérée par agitation au contact de l'air, et aussi par la présence en excès de chlorure de sodium. Si, par contre, la matière azotée contenue dans le milieu de culture, est un sel ammoniacal, de l'asparagine, de la levure, il n'y a pas non plus formation d'*indol*. Le moyen le plus sûr d'en obtenir, d'après *Péré*, serait de cultiver le bacille *Coli* à 37°, dans une solution de peptone pancréatique pure, additionnée seulement d'un peu de phosphate de potasse.

Toutefois, il existe un assez grand nombre de variétés de *Coli*-bacilles, qui, placés dans les meilleures conditions, ne forment jamais les moindres traces d'*indol*; le fait, signalé par *Lembke* (106), a été encore constaté par M. *Ch. Lapierre* (200), dont les observations s'étendent sur un espace de plus de six ans.

Nous avons, de notre côté, fait extemporanément la

recherche de l'indol sur six échantillons de Coli et vingt échantillons d'Eberth tout à fait authentiques, les uns isolés récemment, les autres plus anciens, et entretenus dans les collections du laboratoire. Voici les résultats obtenus à froid :

Réaction positive : *Coli Lan.*, *Coli R²*, *Coli N.*, *Coli From*, *B. prodigiosus*, *V. cholerae*;

Réaction négative : *Tous les Eberth*, *Coli R.*, *Coli Ch.*, *Subtilis*, *Mesentericus*.

Suivant les conseils donnés par MM. Bory (91), du Bureau d'hygiène de Lyon, et G. Roux (116), nous avons opéré consécutivement avec l'aide de la chaleur.

A chaud, quoique plus rapidement, la réaction ne s'est produite qu'avec les mêmes cultures. Par ordre d'apparition, nous pouvons les ranger comme suit :

V. cholerae.

B. prodigiosus.

Coli Lan.

— *N.*

— *R²*.

— *From*.

Ces constatations nous montrent que, si un bacille coliforme sous les autres rapports, donne une réaction d'indol positive, on peut le considérer comme Coli; mais, on n'a pas le droit de nier la nature Coli de ce même bacille, si la réaction de l'indol ne vient pas s'ajouter à la série de ses caractères particuliers.

En résumé, la réaction de l'indol peut donner de bonnes indications. D'après M. G. Roux, cependant, le *bacille typhique* pourrait quelquefois donner une

réaction « *minime* ». D'autre part, il ne faut pas oublier que certaines espèces de Coli-bacilles ne la présentent jamais.

B. — SÉRO-RÉACTION

Entre le bacille d'Eberth et le Coli-bacille, le caractère différentiel le plus important, est, sans contredit, la *séro-réaction*.

La *séro-réaction*, en général, date de la découverte de Charrin et Roger sur le *bacille pyocyannique*, en 1889. Metchnikoff, Issaeff, Ivanoff la retrouvent pour le *pneumocoque*, le *V. Metchnikowi*. En 1894, Pfeiffer fait connaître la *bactériolyse* du *V. cholérique*; et en 1895, Pfeiffer et Kolle font connaître l'*agglutination* des bacilles typhiques cultivés en bouillon additionné de sérum d'animaux immunisés.

C'est à F. Vidal (121) que revient l'honneur d'avoir mis en lumière la valeur de la *séro-réaction*. Entreprise d'abord en vue du diagnostic de la fièvre typhoïde, cette réaction a été employée plus tard pour reconnaître la nature typhique d'un bacille éberthiforme.

Cette méthode, en effet, repose sur l'action d'un sérum contaminé, infectieux, sur une culture de bacilles d'Eberth authentiques. C'est la réciproque que l'on emploie dans le cas de diagnose du bacille typhique, et ici, on recherche l'action d'un sérum typhique sur un bacille de nature éberthiforme.

Prenant donc un sérum de typhique qui aura agglutiné une culture d'Eberth type, on pratiquera avec ce sérum, la *séro-réaction*, sur les bacilles que l'on vou-

dra identifier. Il faudra que ce sérum soit très agglutinant, car, comme nous le verrons tout à l'heure, l'intensité de l'agglutination est un facteur de première importance.

D'après les expériences de séro-diagnostic clinique rapportées par de nombreux auteurs, le bacille d'Eberth est très variablement et très différemment agglutiné par le sérum des typhiques. C'est là un premier défaut, si l'on voit dans cette réaction un procédé de diagnose entre ce bacille et le bacille d'Escherich. Mais, pour compléter la question, il s'agit de savoir quelle sera l'action du sérum immunisé contre le coli, sur les bacilles d'Eberth, et encore de savoir quelle sera l'action du sérum de typhique sur le bacille d'Eberth.

La réponse à la première question nous est donnée par M. Rodet (142). Cet auteur ayant immunisé des moutons contre le bacille d'Eberth et contre le bacille coli, a obtenu des sérums d'un pouvoir agglutinant élevé. En faisant agir réciproquement ces sérums, sur l'un et l'autre bacille, il a vu que, si le bacille coli était presque inerte en présence du sérum Eberth, le bacille d'Eberth était assez sensible à l'action du sérum-Coli lorsqu'il est employé dans les proportions de 1 pour 10 ou 1 pour 15. Il se formait dans le bouillon de petits grumeaux appréciables à l'œil nu au bout de quelques heures et une précipitation lente qui pouvait amener la clarification presque totale du liquide en vingt-quatre heures.

Poursuivant ses expériences, M. Rodet (142) a publié, en 1897, de nouveaux résultats qui montrent que

4 échantillons de B. d'Eberth étaient agglutinés à 1 pour 100 aussi bien par du sérum-Coli de mouton que par du sérum-Eberth. Sur 3 échantillons, l'agglutination à 1 pour 20 était même plus rapide avec le sérum-Coli qu'avec le sérum-Eberth.

De ses expériences, M. Rodet tire des conclusions dont nous citons textuellement la partie suivante : « En présence de sérum d'animaux immunisés, il y a beaucoup moins de différence entre l'ensemble des races dites bacilles d'Eberth, d'une part, et les races de Coli, d'autre part, qu'il n'y en a entre les divers échantillons de bacille d'Eberth comparés les uns aux autres, et surtout entre les diverses races de Coli ; en d'autres termes, par la réaction agglutinative, le bacille d'Eberth se distingue moins du bacille Coli que les diverses variétés de ce dernier ne se distinguent entre elles. »

De l'ensemble de ces divers faits, cliniques ou expérimentaux, il se dégage clairement que le bacille d'Eberth n'est pas le seul microbe agglutinable par le sérum typhique, et, que ce même bacille peut être agglutiné par des sérums, non typhiques, normaux, pathologiques ou immunisants.

Ces faits sembleraient donc prouver que la spécificité de la séro-réaction n'existe pas. On a revisé ces diverses expériences, et la conclusion en a été que la séro-réaction n'était pas quelque chose qui devait être considérée d'une manière absolue, mais bien d'une manière relative : le bacille d'Eberth sera plus agglutiné que le bacille Coli, quand il sera mis en présence de sérum de typhique.

Nous ne croyons pas non plus devoir passer sous silence les expériences qui ont été faites il y a quelque temps à peine par MM. *P. Courmont* et *Gh. Lesieur* (169). Ces auteurs ont essayé l'action agglutinante sur le bacille *Coli*, de nombreux sérums typhiques, tandis qu'ils essayaient la réaction sur un même bacille d'Eberth, et leurs résultats les faisaient ainsi conclure :

« Le bacille typhique, quels que soient la période de la maladie et le pouvoir agglutinant sur le bacille d'Eberth, n'agglutine ordinairement pas le bacille d'Escherich. Lorsque le sérum des typhiques agglutine le bacille *Coli*, c'est à un degré très faible, qui n'a pas de rapport avec l'intensité et les variations du pouvoir agglutinant de ce même sérum sur le bacille d'Eberth et paraît sans grande signification, puisque même des sérums non typhiques peuvent donner une agglutination analogue et même plus accusée ».

D'autre part, on sait aujourd'hui que le sérum d'un animal inoculé avec un Colibacille agglutine à un certain degré ce microbe infectant et peut rester sans action sur un autre Colibacille. Ce phénomène existe aussi pour des microbes autres que le *Colibacille* ; il a été signalé à propos du *Streptococcus*, et c'est justement là une des raisons qui font que l'on n'ose pas réunir toutes les espèces du genre *Streptococcus*, sous une seule dénomination. Le terme *Streptococcus pyogenes* est le nom d'une famille de *Cocci* ; de même, le terme de *Colibacille* est le nom générique d'une réunion de races différentes de *bacilles du Colon*.

MM. *Morel* et *Leclainche* ont souvent constaté ce fait ainsi que MM. *Escherich* et *Nobécourt* (152). Pour

faire le diagnostic de Colibacille, il faudrait donc avoir autant de sérums agglutinants qu'il y a de types de Coli; reste à savoir si la chose sera jamais faisable. Il n'en est pas de même pour le bacille d'Eberth, dont le caractère spécifique est reconnu par la majorité des bactériologistes. L'agglutination d'un bacille à caractères éberthiens, obtenue par un sérum anti-typhique est, de tous les procédés de différenciation, le seul qui puisse, avec une réaction positive à un titre élevé, nous permettre de croire sûrement à la nature éberthienne de ce bacille.

Mais, avons-nous dit plus haut, certains bacilles typhiques authentiques ont une réaction très faible et même quelquefois nulle. Donc, il n'est pas vrai que la séro-réaction soit un caractère diagnostique sérieux, si elle laisse passer ainsi sans les déceler des bacilles d'Eberth types. Il n'en est rien et de nombreux travaux viennent réduire cette objection à sa juste valeur.

Widal et *Sicard* (148 bis), *Durham* (98 bis), *Achard* et *Bensaude* (90), *Stern* (145), *Frænkel* (129 bis), *Kolle* (105 bis), *Van der Velde* (146), *Rodet* (182), *Sacquépée* (205), *Chantemesse* (191), *Emery* (217 bis), *Lapierre* (200) ont donné les résultats qu'ils avaient obtenus en pratiquant la séro-réaction sur des bacilles d'Eberth retirés du sol, de l'eau ou d'organismes morts; tout récemment un travail de M. *Bancel* (209) vient de combler une lacune en étudiant la non-agglutinabilité primitive des bacilles typhiques extraits du sang d'après la méthode du professeur *J. Courmont*. Et tous ces auteurs s'entendent sur leurs conclusions.

Avant de se prononcer sur la nature d'un bacille éberthifome, mais peu ou pas agglutinable, il faut en faire des cultures successives, exaspérer pour ainsi dire leurs propriétés vitales et au lieu d'essayer la séro-réaction, sur une espèce affaiblie par sa végétation dans un milieu peu nutritif ou toxique, l'essayer plus tard lorsque ce bacille aura repris toute sa vigueur et sa virulence. On fera passer le bacille d'ensemencements en ensemencements successifs, ou d'inoculation en inoculations successives, jusqu'au moment où on trouvera un bacille agglutinable par un sérum agglutinant.

Ces faits ne sont pas seuls dans la bactériologie. On connaît un certain nombre de microbes, qui pour posséder à un taux quelquefois même assez faible, la possibilité de s'agglutiner, doivent au préalable passer soit par l'inoculation sous-cutanée ou intra-péritonéale, soit par toute une série d'ensemencements successifs. Cette culture *intensive*, permet d'exalter leurs propriétés virulentes et biologiques, et de les faire servir alors aux expériences de séro-diagnostic. A ce moment-là ou pourra fermement poser le diagnostic de bacille d'Eberth en ayant toujours présent à l'esprit, comme l'a dit M. Achard, que ce n'est pas la *réaction agglutinante elle-même* qui est spécifique, mais bien le *degré* auquel elle s'exerce.

CINQUIÈME PARTIE

Analyses d'Eaux

Pendant une épidémie de fièvre thyphoïde qui éclata à X..., on fit l'analyse de l'eau des puits situés dans la cour des maisons où l'épidémie sévissait.

Nous résumons les différentes recherches faites sur les eaux d'alimentation de ces maisons :

MAISON A

Ensemencement en bouillon de bœuf peptoné et mise à l'étuve à 44°5 :

Résultat négatif

MAISON B

(Possédant une pompe très malpropre, située sur le bord du chemin).

Ensemencement dans un ballon de bouillon de bœuf peptoné. Etuve à 44°.

Résultat négatif

MAISON C

Même milieu.

Résultat négatif

MAISON D

Dans le bouillon de bœuf peptoné, il se produit un trouble uniforme. On constate la présence de quelques rares bacilles mobiles.

MAISON E

(Eau impure, trouble, contenant parfois de petits vers rouges).

1° Dans le même milieu peptoné, apparaissent des diplobacilles. Il se forme des grumeaux. Le bouillon se trouble.

2° Ensemencement en bougie de Cambier. Etuve à 37°. Au bout de 8 jours, bacilles mobiles ne prenant pas le Gram, ne faisant pas virer le tournesol et ne liquéfiant pas la gélatine.

Réaction de Widal : + 1 p. 40, $\pm$ 1. p. 30, — 1. p. 50.

8 jours après, même réaction.

On isole le bacille.

MAISON F

En bouillon peptoné, grumeaux et trouble.

Bacilles mobiles et streptocoques.

MAISON G

(Très malpropre).

1° En bouillon peptoné, grumeaux et trouble.

Bacilles mobiles et streptocoques.

2° Ensemencement en bougie de Cambier. Etuve à 37°.

Résultat positif au bout de 24 heures

On porte alors en bouillon tournesolé : résultat négatif.

On trouve des bacilles mobiles ne prenant pas le Gram et ne liquéfiant pas la gélatine.

Culture très impure à l'intérieur (odeur).

Réaction de Widal négative.

MAISON H

1° En bouillon peptoné, grumeaux et trouble.

Bacilles mobiles et streptocoques

2° En bougie de Cambier : résultat positif au bout de 48 heures.

L'épreuve du bouillon tournesolée est négative :

Subtilis ou Mesentericus

MAISON I

1° Bouillon peptoné : trouble uniforme.

Bacilles mobiles et staphylocoques

2° En bougie de Cambier : résultat positif au bout de 72 heures.

Le bouillon tournesolé ne vire pas.

Bacilles mobiles ne prenant pas le Gram et ne liquéfiant pas la gélatine.

MAISON J

1° Ensemencement à 44°5 : streptocoques.

2° Procédé récent de Chantemesse (3 plaques). Au bout de 24 heures, on peut constater la présence du Coli en grande quantité; il n'y a pas d'Eberth.

3° Procédé de Hume (2 plaques). En 72 heures, mêmes résultats, mais plus nets.

4° Rouge neutre et tournesol : Réaction du Coli.

MAISON K

(Possédant des W. C. dans la cour, à proximité de la pompe).

1° Ensemencement à 44°5. On obtient des bacilles mobiles, polymorphes, ne prenant pas le Gram, donnant une réaction négative avec le tournesol et le neutralroth, ne liquéfiant pas la gélatine. Séro-réaction négative.

2° Procédé récent de Chantemesse (3 plaques). Au bout de 72 heures, on a beaucoup de B. d'Eberth; peu de Coli.

3° Procédé de Hume (2 plaques). Au bout de 72 heures, on obtient les mêmes résultats, plus nets.

4° Rouge neutre et tournesol : Réaction du Coli.

ANALYSE DES EAUX DE Y...

Envoyées le ... 19.., à la suite d'une épidémie de fièvre typhoïde, en grande vitesse, dans cinq bouteilles cachetées :

3 litres d'eau des fontaines de la ville (eau n° 1).

2 litres d'eau d'un puits (eau n° 2).

L'analyse porte sur les bouteilles :

Eau n° 1. — I, II, III.

Eau n° 2. — IV, V.

On ensemence chacune de ces eaux :

A) Pure et simple.

B) Après filtration sur bougie.

C) Après centrifugation simple.

D) Après précipitation et centrifugation.

EAU N° 1

A. — Pure et simple en bouillon ordinaire à 44° 5 :

I: en 48 heures, streptocoques +; bacilles mobiles en 3 jours.

II: en 48 heures, streptocoques +.

III: id id id +.

A. — En milieu et tube de Cambier à 37° 5 :

I: en 36 heures, bacilles mobiles polym. Gram —, gélatine —, tournesol —, neutralroth —.

II : en 36 heures, culture très impure.

III : en 36 heures, bacilles mobiles polym. Gram —, gélatine —, tournesol + (en 12 heures à 44° 5), neutralroth + en 48 heures.

Résultat : Coli et Eberth (non agglutiné).

B. — Après filtration de 2 litres et demi (mélange des trois bouteilles), ensemencement du résidu :

a) En bouillon ordinaire à 44° 5.

1^{er} ballon, + en 24 heures; bacilles mobiles polymorphes. Gram —, gélatine —, tournesol —, neutralroth —, séro-réaction —.

2^e ballon, + en 24 heures; surtout cocci (tétragènes ?); en 3 jours, bacilles polymorphes.

3^e ballon, + en 24 heures; bacilles mobiles polymorphes. Gram —, gélatine —, tournesol — à 44° 5, + à 37° (cocci), neutralroth —.

Bouillon de lavage, + en 12 heures; bacilles polymorphes, moyens, très mobiles. Gram —, tournesol + en 27 heures, neutralroth +.

b) En milieu et tube de Cambier à 37° 5.

1^{er} tube : + en 10 jours, voile; subtilis ?

2^e tube : 0.

3^e tube : 0.

Résultat : Coli et Eberth (non agglutiné).

C. — Après centrifugation simple :

a) En bouillon ordinaire à 44° 5, + en 24 heures; bacilles mobiles, polymorphes. Gram —, tournesol —, neutralroth —, gélatine —.

Résultat : Eberth (non agglutiné).

b) En milieu et tube de Cambier à 37° 5 + en 3 jours : bacilles mobiles. Gram —, tournesol —, gélatine —, neutralroth —, séro-réaction + 1 p. 30.

Résultat : Eberth (non agglutiné).

c) En gélose de Chantemesse à 37° 5, + en 7 jours :
2 colonies blanches, cocci.

Résultat : 0.

D. — Après précipitation (méth. de Vallet) et précipitation.

a) En bouillon ordinaire à 44° 5, + en 24 heures ; bacilles
longs et mobiles. Gram —, tournesol —, neutralroth —,
gélatine —.

Bacille isolé, poussant en trouble uniforme avec voile
léger.

Résultat : Eberth (non agglutiné).

b) En milieu et tube de Cambier à 37° 5, + en 3 jours ;
bacilles moyens, mobiles. Gram —, tournesol + à 48 heures ;
neutralroth + à 24 heures, gélatine —.

Résultat : Coli.

c) En gélose de Chantemesse à 37° 5 : 0.

Résultat : Coli et Eberth (2 races : une agglutinable,
l'autre non agglutinable).

EAU N° 2

A. — Pure et simple :

a) En bouillon ordinaire à 44° 5 ;

IV : en 18 heures, staphylocoques à grains très petits qui
ont grossi en 3 jours ;

V : même résultat ;

Résultat : 0.

b) En milieu et tube de Cambier à 37° 5 ;

IV : 0 ;

V : + en 3 jours ; longs bacilles mobiles ; Gram — ; tour-
nesol — ; neutralroth — ; gélatine + en 2 jours, colonies
vertes : bacille vert de l'eau.

Résultat : 0.

B. — Après filtration de 1 litre 750 sur bougie Cham-
berland :

a) En bouillon ordinaire à 44°5 :

1^{er} ballon : en 36 heures, longs bacilles peu mobiles ;
Gram — ; gélatine — ; tournesol — ; neutralroth — ; séro-
réaction + 1 p. 50 ;

2^e ballon : 0.

Bouillon de lavage : + en 12 heures, longs filaments
immobiles divisés en articles ; voile : (subtilis ?)

Eau du 1^{er} ballon ; bacille isolé : pousse sans voile avec
un trouble uniforme.

Résultat : Eberth (agglutinable).

b) en milieu et tube de Cambier à 37°5 :

1^{er} tube : + en 36 heures : longs bacilles peu mobiles ;
Gram — ; gélatine — ; tournesol — ; neutralroth — ;

2^e tube : + en 4 jours : bacilles mobiles ; Gram — ; tour-
nesol — ; neutralroth — ; séro-réaction + 1 p. 30.

Bacilles isolés : trouble uniforme.

Résultat : Eberth (agglutinable).

C. — Après centrifugation simple :

a) En bouillon ordinaire à 44°5 : + en 36 heures : cocci ;

b) En milieu et tube de Cambier à 37°5 : 0 ;

c) En gélose de Chantemesse à 37°5 : 0 ;

Résultat : 0.

D. — Après précipitation (méth. de Vallet) et centrifu-
gation ;

a) En bouillon ordinaire à 44°5 : 0 ;

b) En milieu et tube de Cambier à 37°5 : 0 ;

c) En gélose de Chantemesse à 37°5 : 0 ;

Résultat : 0.

Conclusions de l'analyse :

Eau n° 1, contaminée ; beaucoup de bacilles d'Eberth,
et beaucoup de bacilles d'Escherich.

Eau n° 2, contaminée ; beaucoup de bacilles Coli ; peu
de bacilles d'Eberth.

D'une manière générale, ces eaux sont à rejeter de
l'alimentation.

SIXIÈME PARTIE

Nous voici arrivé au terme de nos expériences, relatives à la recherche du B. d'Eberth et du Coli bacille dans les eaux de boisson. Nous avons constaté, (en dehors de ce qui a été étudié dans la première partie de ce travail), que partout, pour tous les procédés, il y avait de nombreuses causes d'erreur qui pouvaient faire porter un diagnostic erroné sur la nature typhogène de tel bacille isolé,

Il vient naturellement à l'idée que peut-être, en cumulant, en fondant ensemble deux procédés, on pourrait ainsi du coup avoir les avantages de chacune de ces méthodes, sans en avoir les inconvénients. C'est ce que nous voulons rapidement examiner en quelques lignes.

Et d'abord, en examinant le cas des procédés de culture en milieu phéniqué, et de culture en tube de Cambier, nous pourrions de suite dire que cette combinaison ne peut donner de bons résultats. On sait en effet, que la présence de l'acide phénique dans un

milieu de culture a, entre autres conséquences, celle de diminuer la mobilité des bacilles, et que le bacille d'Eberth est encore bien plus sensible à son action paralysante que le bacille Coli. Dès lors, puisque le procédé de Cambier tire son avantage en tant que culture à travers les parois poreuses d'une bougie, de la grande mobilité du Bacille d'Eberth, nous voyons que ces deux méthodes, si elles venaient à être employées concurremment, contrarieraient leurs effets, en annulant du coup, les avantages particuliers à chacune d'elles. Il ne faut donc pas songer à expérimenter sur un milieu phéniqué et en tube de Cambier.

Nous en dirions autant de la combinaison du procédé de Cambier et du bouillon arsenical de Brouardel et Thoinot.

Peut-être, au contraire, pourrait-on essayer du premier coup, la culture en bouillon de Cambier à la température de 44°5, en faisant subir au milieu extérieur, une série de réensemencements simultanés dans le même milieu et en bouillon au rouge-neutre, toujours à cette même température. Nous avons vu, en effet, que la chaleur n'exerçait pas une notable influence sur la mobilité du bacille d'Eberth ni sur celle du bacille Coli, du moins en milieu de Cambier. C'est peut-être là, le bouillon à l'aide duquel on arrivera à exalter suffisamment les propriétés biologiques du bacille typhique, pour pouvoir le distinguer du bacille Coli, par certaines réactions positives, la séro-réaction, par exemple.

Après ce simple aperçu de combinaisons possibles ou impossibles, de méthodes de recherche et de diffé-

renciation. en revenant rapidement sur les résultats que nous avons acquis, nous nous croyons autorisés à établir les conclusions suivantes :

CONCLUSIONS

I. — La recherche du bacille typhique dans l'eau, moins facile qu'on ne le pensa d'abord à la suite de la découverte d'Eberth et de Gaffky, nous paraît cependant pouvoir être notablement perfectionnée et simplifiée par l'application de plusieurs procédés récents.

II. — La difficulté de cette recherche résulte :

1° de la dissémination des microbes dans l'eau ;

2° de l'existence de nombreuses espèces aquatiles saprophytiques ;

3° de l'association presque constante du Colibacille au bacille d'Eberth, dans les eaux typhogènes ;

4° de la ressemblance presque absolue de ces deux microbes, au point de vue morphologique et biologique.

III. — Pour remédier à la grande dissémination des microbes dans l'eau, on a proposé :

a) de filtrer de grandes quantités d'eau sur bougie et d'en analyser le résidu ;

b) de centrifuger une partie des échantillons et d'analyser le dépôt ;

c) de faciliter la pullulation rapide et abondante de ces microbes, etc..

Nous donnons la préférence à la filtration sous pres-

sion de grandes quantités d'eau sur bougie Chamberland, suivie de l'ensemencement du résidu.

IV. — Pour se mettre à l'abri des espèces aquatiles banales, on a conseillé :

a) L'addition d'antiseptiques aux différents milieux de culture (ac. phénique, iodure de potassium, krystall-violet, glyco-taurocholate de soude) ;

b) La culture à la température de 44° 5 ;

c) L'association de ces deux procédés, etc.

Nous plaçons au premier rang la culture à 44° 5, suivant la méthode du professeur Rodet.

V. — Pour éviter le développement exclusif du Colibacille, on a essayé :

a) L'usage de milieux spéciaux, antiseptiques (milieux d'Elsner, de Pierkowsky, de Chantemesse, de Hume, etc.) ;

b) L'usage de milieux vaccinés par une première végétation ou par l'addition de sérum anticolibacillaire :

c) Le passage des cultures à travers les parois des bougies poreuses filtrantes, etc.

C'est à ce dernier procédé dû à Cambier que nous donnons la préférence, à la condition expresse qu'il soit employé dans des conditions très strictes de surveillance fréquente (au moins toutes les 3 heures).

VI. — Pour différencier l'un de l'autre le bacille d'Eberth et le colibacille :

a) La gélatine, la pomme de terre, le lait, etc., constituent des milieux insuffisants ;

b) La recherche de l'indol et la séro-réaction n'ont de valeur que si elles sont positives ;

c) Le tournesol et le neutral-roth nous paraissent être les procédés de choix.

VII. — En résumé, notre technique idéale serait la suivante dans les cas les plus compliqués :

a) Filtration de grandes quantités d'eau sur bougie Chamberland ;

b) Ensemencement du résidu en bouillon à 44° 5 ;

c) Repiquage en milieu et bougie de Cambier à 37°, en cas de résultats positifs (bacilles mobiles ne gardant pas le Gram) ;

d) Ensemencement des premiers bacilles qui auront traversé la paroi poreuse, en milieux au tournesol et au rouge-neutre ;

e) Ensemencement de ces mêmes bacilles en gélose au rouge-neutre et au krystall-violet.

VIII. — En s'adressant ainsi, non pas à l'un quelconque des procédés récents, mais à la combinaison de plusieurs d'entre eux, on aura facilement, en huit jours, des résultats positifs, dans le cas d'eaux typhogènes.

Vu :

Le Président de la Thèse,
ARLOING.

Vu :

Pour le Doyen, l'Assesseur,
LACASSAGNE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 10 décembre 1902

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université.
G. COMPAYRÉ.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1880

1. EBERTH. — Die Organismen in den Organen bei Typhus abd. (Virchow's Arch. LXXXI).

1881

2. KOCH. — Zu Unters. von pathogenen Organismen (Mitth. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, I, p. 43).
3. MEUNIER. — Union médicale et scientifique du Nord-Est, V, p. 221.

1884

4. GAFFKY. — Zur Aetiologie der Abdominaltyphus (Mitth. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte II, p. 372).

1885

5. ESCHERICH. — Beiträge zur Kenntniss der Darmbakterien (Munch. med. Wochensch., p. 43).
6. FRAENKEL und SIMMONDS. — Die aetiologische Bedeutung des B. Typhosus (Centralb. f. Klin. Medic. n° 39, p. 675).
7. MEADE BOLTON. — Ueber das Verhalten verschiedener Bakterienarten im Trinkwasser (Zeits. f. Hyg., I, p. 76).
8. MICHAEL IVAN. — Typhusbacillus im Trinkwasser. (Fortschr. der Med. p. 353).
9. MOERS. — Die Brunnen der Stadt Mülheim-am-Rhein von bakteriologischen Standpunct aus betrachtet (Centr. f. allg. Gesundheitspflege, II, p. 133).
10. SEITZ. — Bakteriologische Studien zur Typhusaetiologie. München.
11. WOLFHUGEL und RIEDEL. — Die Vermehrung der Bakterien im Wasser (Arbeit aus der Kaiserl. Gesundheitsamte, II, p. 445).

1887

12. ARNOULD. — L'eau et les bactéries. (Revue d'Hygiène, IX, p. 27, 47).
13. CHANTEMESSE et WIDAL. — Archives de Physiologie, IX, p. 230.
14. GARRÉ. — Ueber Antagonisten unter den Backterien (Corresp. f. Schweizer Aerzte, n° 13, p. 385).
15. LOIR. — Recherche du B. typhique dans les eaux d'alimentation de la ville de Paris. (Ann. Inst. Pasteur, p. 488).
16. THOINOT. — Présence du B. typhique dans l'eau de la Seine à Ivry. (Bull. Acad. de Méd., 5 avril).

1888

17. BIRCH-HIRSCHFELD. — Ueber die Züchtung von B. Typhosus in gefaerbten Nahrloesungen (Arch. f. Hyg. VII, p. 87).
18. BUCHNER. — Centralblatt für Bacteriologie, usw... IV, p. 356.
19. DE FREUNDENREICH. — Annales de l'Institut Pasteur, II, p. 200.
20. MACÉ. — L'analyse bactériologique de l'eau (Ann. d'Hyg. publique, XIV, p. 501).

1889

21. CHANTEMESSE ET WIDAL. — Différenciation du B. typhique et du Coli Communis (C.-R. de l'Acad. des Sciences, 9 novembre).
22. KARLINSKY. — Ueber das Verhalten der Typhusbacillus in Brunnenwasser (Arch. f. Hyg. IX, p. 432).
23. KITASATO. — Zeitschrift für Hygiene, p. 515.
24. RODET. — C.-R. de la Société de Biologie, n° 26.
25. STRAUSS ET DUBARRY. — Recherches sur la durée de la vie des microbes pathogènes dans l'eau (Arch. de méd. exp. p. 55).
26. VAILLARD. — Contribution à l'étiologie de la fièvre typhoïde (Bull. de la Soc. méd. des Hôpitaux, p. 505).

27. WEICHSELBAUM. — Bakteriologische Untersuchung des Wassers der Wiener Hochquellleitung. (Das Oesterr. Sanitätswesen, nos 14 u. 23).

1890

28. CARPENTIER. — De la nécessité d'analyse des eaux alimentaires (Arch. méd. belges 3^e sér. XXXVII, p. 30).
29. CASSEDEBAT. — Sur un bacille pseudo-typhique trouvé dans les eaux de rivière — (C.-R. de l'Acad. des Sc. CX. p. 798).
30. GASSER. — Sur un nouveau procédé de diagnostic différentiel du B. typhique. (C.-R. Soc. de Biologie, p. 463).
31. GASSER. — Culture du B. typhique en milieux nutritifs colorés. (Arch. méd., exp. II, 750).
32. GASSER. — Etudes bactériologiques sur l'étiologie de la fièvre typhoïde. Thèse de Paris.
33. HOLZ. — Experimentelle Untersuchungen uber den Nachweiss des B. Typhosus. (Zeits. f. Hyg, p. 143).
34. KARLINSKY. — Ein Beitrag zur Kenntniss des Verhaltens des B. Typhosus in Trinkwasser. (Arch. f. Hyg. X. 364).
35. LUSTIG. — Diagnostica dei batteri nelle Acqua. Turin.
36. PARIETTI. — Methodo di ricerca del B. Typhosus nelle acque potabili. (Riv. d'igiene e san. publica).
37. PETRUSKY. — Die Anwendung der Lakmusreaction zur Differenzierung der B. typhosus von aehnlichen Bakterienarten. (Centr. f. Bakt., usw... VII).
38. RODET. — Sur la recherche du B. typhique dans l'eau. (C.-R. Soc. de Biologie, II, p. 91).
39. VAUGHAN. — The examination of drinking water with special reference to its relation to typhoid fever. (Med. News. LVI, 641).
40. VINCENT. — Sur un nouveau procédé d'isolement du B. Typhique. (C.-R. Soc. de Biologie, p. 62).

1891

41. HAGEN AND WHITE. — On an application of agar-plate cultures to water analysis, with special reference to the detection of the Bacillus of typhoid fever. Boston. M. S. J. CXXIV. 407.

42. MIQUEL. — Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux. Paris.
43. PÉRÉ. — Contribution à l'étude des eaux d'Alger (Ann. hist. Pasteur, V, 79).
44. SORMANI. — Dimostrazione del B. di Eberth nelle acque potabili di Pisa, (Riv. d'ig. e san. pub., II, 897).
45. WURTZ. — V. in C. R. de la Société de Biologie, 12 décembre, p. 828.

1892

46. DUNBAR. — Untersuchungen ueber den B. Typhosus und den B. Coli communis (Zeits. f. Hyg. XII, p. 485).
47. VAN ERMENGHEIM und VAN LAER. — Contribution à l'étude des propriétés biochimiques du B. typhique et du B. Coli communis. (Bull. de méd. de Gand).
48. FERRATI. — Zur Unterscheidung der B. Typhosus von B. Coli communis (Arch. f. Hyg. XVI).
49. KAMEN. — Zum Nachweise der B. Typhosus im Trinkwasser. (Centr. f. Bact., usw., XI, 33).
50. KLEMENSIEWITZ. — Recherches sur le B. typhique. (Bull. méd. 237).
51. LESAGE. — Contribution à l'étude du B. Coli communis. (Sem. méd. n° 6.).
52. MACAIGNE. — Le B. Coli communis. Th. Paris.
53. PÉRÉ. — Ann. Inst. Pasteur, VI, p. 512.
54. ROUX. — Précis d'analyse microbiologique des eaux, in-12°, Paris.
55. SILVESTRI. — Sopra alcuni carattere de differenziano nettamente il B. typhosus del B. Coli communis. (Riv. gen. ital. di Clinica med.).
56. VALLET. — Le B. Coli communis dans ses rapports avec le B. typhique. Th. Lyon.
57. VINCENT. — La recherche du B. typhique et du B. Coli dans les eaux de boisson. (Intern. Cong. Hyg. a Dem., 1891, II, 278, London).
58. WIDAL. — Le Coli-bacille. (Gaz. heb. de med. et de chir., p. 2).

1893

59. BLACHSTEIN. — Contribution à l'étude microbiologique de l'eau. (Ann. Inst. Pasteur, VII, p. 689).
60. CHANTEMESSE. — V. in Traité de médecine de Charcot et Bouchard, I, p. 719.
61. GERMANO und MOREA. — Vergleichende Untersuchungen ueber Typhus-bacillus und aehnliche Backterien. (Zieglers Beiträge, XII, 494).
62. HALLÉ et DINARD. — Note sur la culture du B. Coli communis dans l'urine. (C. R. Soc. Biol. p. 320).
63. KIESSLING. — Das B. Coli communis. (Hygienische Rundschau, 15 août).
64. LUSTIG. — Diagnostick der Backterien des Wassers, in-8°, Iéna.
65. NEISSER. — Untersuchungen ueber den B. typhosus und das B. Coli commune (Zeit. f. Klin. med. XXIII, p. 93).
66. REMY et SUGG. — Recherches sur le B. d'Eberth. (Ann. de la Soc. de méd. de Gand).

1894

67. ETIENNE. — Note sur une modification de la coagulation du lait, par le B. Coli communis. (C. R. Soc. de Biol., 20 janvier).
68. FREMLIM. — Vergleichende Studien am B. C. C. verschiedener Provenenz. (Arch. f. Hyg. XIX, 295).
69. JORDAN. — The identification of the typhoid fever Bacillus. (Journ. of the Amer. med. Ass., December).
70. GORINI. — Sopra un nuovo criterio diagnostico del B. typhosus. (R. d'Hyg. XVI, 589).
71. GRIMBERT. — Recherche de l'Eberth dans l'eau. (C. R., Soc. de Biol., p. 399).
72. GRIMBERT. — Sur la recherche du B. typhique dans les eaux. (Journ. de Phys. et Ch., XXX, 8).
73. LIGNIÈRES. — Nouveau moyen d'isolement du B. Coli communis. (C. R., Société Biol., p. 200).
74. NICOLLE. — Nouveaux faits relatifs à l'impossibilité d'isoler par les méthodes actuelles le B. d'Eberth en présence du B. Coli. (Ann. Inst. Pasteur, VIII, 854).

75. PISENTI. — Beziehungen zwischen den B. Coli com, und der Typhusinfektion. (C. f. Bact., XVI, 699).
- 75^{bis}. SCHILD. — Eine Thyphusepidemie mit nachweisbarer Entshungsursache und die Diagnose des B. typhosus mittels Formalin. (Zeit. f. Hyg., XVI, 373).
76. URY. — Untersuchung ueber Identität des B. C. C. und den,... B. Typhosus. (Arch. f. exp. Path. u. Pharm., LXXXIII, 464).
77. WEENEY. — Demonstration of the B. typhosus in suspected water by Parietti's method. (Brit. med. journ., I, p. 961).

1895

78. ABBA. — Sulla presenza del B. Coli nelle acque potabili e sopra un methodo per metterlo in evidenza. — (Rif. med. XI, 302).
79. BRIEGER. — V. in Deutsch med. Wochensch., n° 50, p. 835.
80. CONOR. — Le B. C. C. et ses variations considérées particulièrement dans son pouvoir zymotique. Th. Lyon.
81. COURMONT. — V. in Lyon médical, LXXXI, p. 582.
82. ELSNER. — Untersuchungen ueber electives Wachstum des B. Coli und des B. typhosus, und dessen diagnostische Verwertbarkeit. (Zeit. f. Hyg. XXI).
83. FREMDENREICH. — De la recherche du B. C. C. dans l'eau. (Ann. de microgr. VII, 326).
84. LAZARUS. — V. in Berlin. klin. Wochensch., n° 49, p. 1068.
85. LIESENER. — V. in Arbeit aus dem kaiserl. Gesundheits., XI, p. 207.
86. PERCY und FRANKLAND. — Ueber das Verhalten des B. typhosus und des B. C. C. in Trinkwasser (Zeitsfür Hyg. XIX. p. 393).
87. RIO (A. DEL). — Ueber einige Arten von Wasserbakterien die auf die gelatinsplatte typhusaähnlicher Wachstum zeigen. (Arch. f. Hyg. XXII, p. 91).
88. SMITH. — Ueber den Nachweiss des B. C. C. im Wasser. (C. f. Bact. XXIII, p. 494).

1896

89. ABBA. — Ueber ein Verfahren den B. C. C. schnell und sicher aus dem Wasser zu isolieren. (C. f. Baekt. XIX, p. 13).
90. ACHARD ET BENSAUDE. — Sur l'agglutinat des divers échantillons de B. typhique et de B. paratyphiques. (Arch. de physio., p. 940).
91. BORY. — V. in Faideau. Th. Lyon.
92. CAPPALDI UND PROSKAUER. — Beitrage zur Kenntniss der Saeurebildung bei B. typhosus und B. C. C. — Eine differentialdiagnostische Studie. (Zeit. f. Hyg. XXIII, p. 452).
93. CHANTEMESSE. — V. in C. R. Société de Biologie, p. 215.
94. CHIZOLLA. — V. in Settimana medica dello sperimentale, p. 335.
95. COREIL. — L'eau potable. Paris.
96. COURMONT P. — V. in C. R. Société de Biologie, p. 688.
97. COURMONT P. — Technique et valeur du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. (Prov. méd. 12 déc.)
98. COURMONT P. — 240 cas de séro-diagnostic chez les typhiques. (Prov. méd., passim).
- 98^{bis}. DURHAM. — Journ. of Pathology... juillet, p. 35.
99. ELSNER. — Lettre à « La Presse Médicale », p. 35.
100. ELSNER. — V. in Société de médecine interne de Berlin, 10 juin.
101. FAIDEAU. — Thèse de Lyon.
102. FREUNDENREICH. — De la recherche du B. C. C. dans l'eau. (Ann. de microg. VIII, p. 414.)
103. GRIMBERT. — Sur un milieu d'Elsner artificiel, (C. R. Société Biol. 25 juillet).
104. GRUBERT. — Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Cholera-vibrio und des B. typhosus. (Munich, med. Woch., p. 285).
105. XXX... — Detection of the B. typhosus, The Lancet. II, p. 391.
- 105^{bis}. KOLLE. — Deutsch. med. Woch., p. 152.
106. LEMBKE. — Bacterium Coli anindolicum und B. Coli anaerogenes (Arch. f. Hyg. XXVII, p. 384).

107. LEMOINE. — V. in Bulletin de la Société Médicale des Hôpitaux, XIII, p. 675.
108. MILLS. — V. in La Clinique de Bruxelles, 30 juillet.
109. PIERKOWSKI. — Ueber die Differenzierung von B. C. C. und B. T. auf Harnnährsubstraten, C. f. Bact. XIX, 686.
110. PFEIFFER UND KOLLE. — Ueber die specifische immunitäts reaction des B. typhosus. Zeits. f. Hyg. LXXI, 203.
111. POLLAK. — V. in Centr. f. inn. Méd. n° 31, p. 785.
112. RAMOND. — Nouveau milieu pouvant servir à différencier le B. typhique et le B. C. C. Presse méd., 8 août, p. 392.
113. REFIEK. — Sur les divers types de Colibacilles des eaux. Ann. Inst. Pasteur LX, p. 242.
114. REMLINGER. — Présence dans l'eau du B. d'Eberth. C. R. Société Biologie, p. 803.
115. ROUX. — V. in Lyon médical, t. LXXXII, p. 85.
116. RODET. — Société de Biologie, 25 juillet.
117. SILVESTRINI. — V. in Settimana med. dello sperimentale, p. 424.
118. SINEW. — Med. Obozr, XLV, 2.
119. THOINOT et MASSELIN. — Précis de Microbie. Paris. Masson.
120. TROUILLET. — V. in Dauphiné médical, p. 405.
121. WIDAL. — Séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. Presse médicale.
122. WITTLIN. — Des bactéries susceptibles de se développer lorsqu'on emploie la méthode de Parietti pour l'analyse bactériologique de l'eau.

123. BARTOSCHEWITCH. — Application de la réaction de Widal pour la recherche du B. Typhique dans l'eau. Presse médicale, 2 juin.
124. BECO. — Sur la valeur sémiologique du séro-diagn. de la f. typhoïde. Ann. de la Soc. méd. chir. de Liège.
125. BESSON. — Découverte du B. typhique dans l'eau par le procédé d'Elsner. Ass. franç. pour l'Av. des Sciences. C. R. 1896, XXV, pt. 2, 733.

126. BIBERSTEIN. — Zeit. f. Hyg. Bd. XXVII, p. 347.
127. BREVILLE. — Des procédés actuels d'appréciation de la valeur hygiénique des eaux potables. Thèse de Paris.
128. COURMONT (J.). — Précis de bactériologie pratique. Paris. O. Doin.
129. DINEUR. — Cité par Biberstein. Zeit. f. Hyg. Bd. XXVII.
- 129^{bis}. FRAENKEL. — Deutsch. méd. Woch(cité par Bancel).
130. GRAZIANI. — De l'emploi des phtaléines pour reconnaître le B. C. C., et B. T. et le B. virgule. Arch. de méd. exp. IX, p. 98.
131. HUGOUNENC. — Nouvelle fonction chimique commune au B. T. et au B. C. C.. C. R. Soc. Biol., 20 février.
132. JEMMA. — V. in Munch. und Wochensch, p. 944.
133. JEZ. — Wiener Med. Wochenschrift, n° 3,
134. JOHNSTON. — An experiment with the serum reaction as a test for typhoid infection in water. New-York Med. Journ., 5 juin.
135. KASHIDA. — Differenzierung des Typhusbacillen vom B. C. commune durch die Ammoniakreaction. C. f. Bakt. XXI. 802.
136. KUHNAU. — Cité par Biberstein. Zeit. f. Hygiene XXVII.
137. LAMBOTTE. — Recherches sur le diagnostic pratique de quelques microbes par les substances agglutinantes. Bull. Acad. Méd. Belgique. 646.
138. POUCHET et BONJEAN. — Contribution à l'analyse des eaux potables. Ann. d'Hyg. 3^e série, t. XXXVII, p. 150.
139. POUJOL. — Sur la fréquence du B. C. C. dans les eaux potables. C. R. de Soc. de Biologie, 20 Novembre.
140. REMLINGER. — Contribution à l'étude du B. typhique. Ann. Inst. Pasteur. XI. 55.
141. ROBIN. — Nouveau milieu coloré pour la différenciation du B. B. C. et du B. T. — C. R. Soc. Biol., 26 janvier.
142. RODET. — Sur les propriétés du sérum de mouton immunisé contre le B. T. et le B. C. C. — C. R. Soc. Biol. 874.

143. ROUX. — De l'expérimentation physiologique appliquée à l'analyse bactériologique des eaux. Lyon Méd., 28 Mars. 435.
144. STERLING. — Ueber die Elsnerische Methode des Nachweiss des B. T. — C. f. Bakt., t. XXII, p. 334.
145. STERN. — Berlin. Klin. Wochenschrift.
146. VAN DE VELDE. — Etudes sur les résultats négatifs obtenus par la méthode de Widal dans le séro-diagn. de la F. typhoïde. Bull. Acad. Méd. Belgique.
147. VAN ORDT. — Munch. Wochenschrift.
148. ZIENCKE. — Deutsche Méd. Woch.
- 148^{bis}. VIDAL et SICARD. — Annales Institut Pasteur, 25 mai.

1898

149. BUSCH. — Ueber das Vorkommen von Typhus im Knochenmark. Zeit f. Hyg., XXVIII, 478.
150. GRIMBERT. — Action du B. C. C. et du B. T. sur les nitrates. C. R., Soc. Biol., 10 décembre.
151. MÉRIEUX et CARRÉ. — Contribution à la recherche du B. C. C. et du B. T. dans les eaux potables. Lyon Méd., 13 nov., p. 335.
152. NOBÉCOURT. — Société de Biologie, 26 novembre.
153. RETOUT. — V. in Thèses de Paris.
154. ROGER. — Société de Biologie, 16 juillet, p. 769.
155. ROTHBERGER. — Differenzialdiagnostische Untersuchungen mit Gefärbten Nährböden, C. f. B., XXIV, p. 513.
156. ROUX. — Précis de Microbie et de Technique bactériologique. Lyon.
157. THOINOT-BROUARDEL. — Sur un caractère différentiel entre le B. T. et le B. C. C. Soc. de Méd. des Hôp., 18 mars.

1899

158. BROCHARD. — Contribution à l'étude des procédés d'isolement du B. T. Thèse de Bordeaux.
159. FISCHER. — Welchen praktisch. Wert hat die Widal'sche Reaction? Zeit f. Hyg., Bd. XXXII.
160. GAUTIER. — V. in Thèses de Toulouse, n° 331.

- 161. HESSE. — Die Typhusepidemie in Lobtau im Jahre 1899. Zeit. f. Hyg., XXXII.
- 162. PIORKOWSKY. — Ein einfaches Verfahren zur Sicherstellung des Typhusdiagnose. Berl., klin. Wochenschr., n° 7, p. 145.
- 163. ROTHBERGER. — Differenzialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden, C. f. B. XXV, p. 15, n° 69.
- 164. ROUX. — Discussion sur la fièvre typhoïde. Lyon Méd., 228-443.
- 165. ROUX. — Sur une oxydase (culture sur artichaut), productrice du pigment sécrété par le B. C. C. — C. R., Acad. des Sc., p. 693.
- 166. SCHUMACHER. — Bermerkung zu einem Fall von Thyphus abd. mit fehlender Widal'scher Reaction. Zeit. f. Hyg., XXX.

1900

- 167. BARATIER. — L'eau potable des Ingénieurs. Trib. médicale. Paris, 2 s. XXXIII, 972.
- 168. CHICK. — The distribution of B. C. C. Thompson Yates, labor. rep. vol. I.
- 169. COURMONT (P.) et Ch. LESIEUR. — Le bacille Coli est-il agglutiné par le sang des typhiques? Presse méd. Paris, II, 403.
- 170. GALAL. — Meth. v. D. Piorkowski zum Nachweiss des B. T. Wogennomedizinsk. Shurn. 5, Russich.
- 171. GASSER. — L'analyse biologique des eaux potables. Masson, Paris.
- 172. GRIMBERT et LEGROS. — B. C. et B. T. — C. R. Soc. biol., 1075.
- 173. GUÉCHOFF. — Thèse de Montpellier.
- 174. HILBERT. — Ueber den Wert der Hankin'schen Methode zum Nachweiss von Typhusbacillen in Wasser. C. f. B. XXVIII, 526.
- 175. KREISEL. — Studien ueber Colibacillen. C. f. B. XXVIII, 865.
- 176. MACCONKEY. — The Lancet, 7 juillet.
- 177. MACCONKEY. — Experiments on the differ. and isolation from mixtures of the B. C. C. and B. T. by the

use of sugar and the salts of bile. Thompson Yates
labord. rep. pt. I, p. 41.

178. MANKOWSKY. — Ein neues Narhsubstrat zur Isolierung
von B. T. und B. C. c. — C. f. B. XXVII, 23,
179. RAMBOUSECK. — Vergleichende und Kritische Studien
betreffend die diagnostik des B. T. und des B. C. C.
Arch. f. Hyg., 382.
180. REMY. — V. in Ann. Inst. Pasteur, n° 8.
181. REMY. — Contribution à l'étude de la fièvre typhoïde
et de son bacille. Ann. Inst. Pasteur, 705.
182. RODET. — Sur l'agglutination du B. d'Erbeth et du
B. Coli. Journ. Phys. et Path. gén. II, 454, 629.
183. RODET. — Comptes rendus Soc. biologie. II, 768.
184. SCHEFFLER. — C. f. B. Bd. XXVIII, p. 499.
185. ZUNE et BONJEAN. — Traité d'analyse chimique, micro-
graphique et microbiologique des eaux potables.
Paris, J. Rousset.

1901

186. ASCOLI. — Il B. C. C., e lo sua Termogenesi, Stomaco.
Napoli, VII, 25.
187. BIFFI. — A proposito di un nuoyo methodo d'isola-
mento del bacillo del tifo. Riforma med., p. 27.
188. BORDAS. — Appareils pour la concentration des bacté-
ries contenues dans les eaux. Journ. Pharm. et
Chimie, t. XIV, p. 294.
189. BORMANS. — Sulla differenziazione tra il bacillo di
Eberth e il B. C. C. Giorn. d. R. Accad. di Med. di
Torino, 4 s. VII, 563.
190. CAMBIER. — Sur une méthode de recherche du B. T.
C. R. Acad. Sciences, 1442.
191. CHANTEMESSE. — Recherche du B. T. dans l'eau
potable. Presse méd., 261.
192. EMERY. — Recherche du B. T. dans l'eau. C. R. de la
Soc. de Biol., p. 979.
193. GASSER. — Analyse biologique des eaux potables,
Masson, Paris.
194. GELESKOFF. — Contribution expérimentale à la con-
naissance des méthodes propres à décelér dans
l'eau le B. T. et les Variétés de B. C. Thèse de
Montpellier.

195. GRIMBERT et LEGROS. — Sur un milieu lactosé destiné à remplacer le petit lait tournesolé de Petensky. C. R. Soc. Biol., 912.
196. HERROKS. — On introduction to the bacteriological examination of water, London (Churchill).
197. HUNERMANN. — Ueber den Wert der Widal'schen serumreaction bei Typhus nach den Erfahrungen an 357 Krankheitsfällen. Deutsch. militärärztl. Zeitsch., p. 387.
198. HUNTER. — A method of distinguishing B.C.C. from B. T. by the use of neutral red. Lancet. I 613.
199. HUNTER. — The diagnosis of the présence of. B. C. C. by means of neutral red. Brit. med. journ. n° 2125, p. 791.
200. LAPIERRE. — Le B. C. C. et ses variétés. C. R. soc. Biol., 779.
201. MACÉ. — Bactériologie. Paris. J. B. Baillière.
202. MAKGILL. — The neutral-red reaction as a means detecting B. C. in water supplies. Journ. of Hyg., p. 430.
203. REMLINGER. — La méthode d'Elsner en bactériologie. Gaz. méd. d'Orient, n° 79.
204. RODET et ZAIMMANN. — Injections intraspléniques de B. T. et B. C. C. Montpellier méd. 2 s. XII, 72.
205. SACQUÉPÉE. — Variabilité de l'aptitude agglutinative du B. T. Ann. Inst. Pasteur, 249.
206. SAVAGE. — British méd. journ., 17 août, p. 400.
207. SAVAGE. — Neutral red in the routine bacteriological examination of water. Brit. med. journ. 400.
208. VALLET. — Une nouvelle technique pour la recherche du B. T. dans les eaux de boissons. Arch. de méd. expér. et d'an. path. p. 557.

1902

209. BANCEL. — Journ. de physiologie et de path. gén. n° 13, p. 519 et n° 4.
210. BIFFI. — Su di un nuovo metodo d'isolamento del bacillo del tifo. Riforma med. p. 27.
211. BORDAS. — Analyse bactériologique des eaux potables. Journ. pharm. et chimie, n° 9, p. 431, 433.

212. BORMANS. — Sulla differenziazione tra il bacillo del tifo ed il B. C. C. Riv. d'ig. e san. pubbl. n° 10, 11, p. 393, 423.
213. BUSQUET. — Contribution à la recherche du B. d'Eberth dans les eaux. Ann. d'hyg. publ. XLVIII, n° 1, p. 14-19.
214. CAMBIER. — Note sur une nouvelle méthode de recherche du B. d'Eberth. Revue d'Hyg., p. 64.
215. CHANTEMESSE. — Gélodiagnostie de la fièvre typhoïde. Presse méd. 16 juillet, p. 675.
216. DAKURA. — Beiträge zur Sicherstellung der Typhusdiagnose auf Grundbakteriologischen Untersuchungen. C. F. B. XXXII, n° 4, p. 115.
217. DRIGALSKI et CONRADI. — V. in Zeitschr. f. Hygiène, p. 283.
- 217^{bis}. EMERY. — Revue d'hygiène, février.
218. FORD. — Varieties of colon bacilli isolated from man. C. f. B. XXII, n° 5, p. 140.
- 218^{bis}. GRUNAUM et HUME. — In British medical journal, p. 1473.
219. HIGLEY. — The detection of typhoid bacilli in the feces as a diagnostic test of typhoid fever. Med. News, n° 13, p. 584.
220. HISS. DR. PH. H. — New and simple media for the differentiation of the colonies of typhoid, colon, and allied bacilli. Journ. of med. research, vol. VIII, n° 1, p. 148.
221. IRONS (E. E.). — Neutral red in the routine examination of water. Journ. of hyg. Vol. II, n° 3, p. 314.
222. JOCHMANN. — Zur Schnelldiagnose der Typhusbacillen. C. f. B. vol. XXXII, n° 6, p. 460.
223. KLINGER (P.). — Beitrag zum v. Drigalski-Conradi, schen Verfahren des Typhusbacillennachweises und zur Identifizierung typhusverdächtiger Bacillen durch die Agglutinationsprobe. C. f. B. Bd XXXII, n° 7, p. 542.
224. KLOPSTOCK (M.). — Beitrag zur differenzierung von Typhus, Coli, und Rahrbacillus. C. f. Bd. XXXII, 11, p. 336.

225. KRAUSE (F.). — Beitrag zur Kulturellen Typhusdiagnose. C. f. B. Bd. XXXII, 44, p. 337.
 226. LESIEUR. — Du procédé de Cambier pour l'isolement du B. d'Eberth. Journ. phys. et path. gén., p. 672.
 227. MOORE. — The isolation of the typhoïdbacillus. C. f. B., Bd. XXXI, n° 17, p. 554.
 228. NICOLLE CH. et M. TRENEL. — Recherches sur le phénomène de l'agglutination. Ann. Inst. Pasteur, n° 8, p. 562.
 229. PALANDINO. — Ricerche sulle sostanze attive nelle tiphoculture. C. f. B., XXXI, n° 18, p. 561.
 230. PIORKOWSKI. — Bemerkungen zu dem Referat v. Drigalski's betr. die Hagemann'sche Arbeit: Der gegenwärtige Stand der Typhusdiagnostik. C. f. B. XXXII, n° 6, p. 178.
 231. POLACCO. — Neuere Untersuchungen über frühzeitigen Typhusdiagnose. C. f. B. XXXI, n° 19, p. 603.
 232. ROSENBERGER. — The identification of the colon bacillus by reactions produced in culture media containing neutral red. Philad. med. Journ., n° 10, p. 446.
 233. SAVAGE (W. G.). — The significance of B. C. in drinking Water. Journ. of Hyg., vol. II, n° 3 p. 320.
 234. THOINOT ET MASSELIN. — Précis de Microbie, Paris, page 716.
 235. VEEDER (M.A.). — Thyphoïd fever from sources other than water supply. — Med. Rec., Vol. LXII, n° 4, page 121 - 124.
 236. WENDT (J.). — Nachprüfung der Weil'schen methode zur Schnelldiagnose der Typhusbacillen. (Inaug. Dis.). Koenigsberg, page 53.
-

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos	9
Historique	13

PREMIÈRE PARTIE

Concentration des Microbes

Ch. I. — Filtration	21
Ch. II. — Pullulation	26
Ch. III. — Centrifugation simple	29
Ch. IV. — Précipitation et centrifugation	30

DEUXIÈME PARTIE

Élimination des microbes vulgaires

Ch. I. — Acide phénique; milieux solides	33
Ch. II. — Acide phénique; milieux liquides	39
Ch. III. — Autres antiseptiques: taurocholates de soude, krystall-violet	47
Ch. IV. — Chaleur	49

TROISIÈME PARTIE

Séparation de l'Eberth d'avec le Coli

Ch. I. — Gélatine d'Elsner	53
Ch. II. — Procédé de Pierkowsky	56
Ch. III. — Géloses lactosées (tournesol ou rouge neutre) et phéniquées (ou krystall-violet)	59
Ch. IV. — Vaccination des milieux	66
Ch. V. — Procédé de Cambier	75

QUATRIÈME PARTIE

Identification de l'Eberth et du Coli

Ch. I. — Culture en milieux solides : a) pomme de terre b) artichaut	81 83
Ch. II. — Culture en milieux liquides: a-b) Lait et milieux lactosés et tournesolés c) Neutral-roth	86 91
d) Bouillon arsenical	98
Ch. III. — Réactions spéciales: a) Réaction de l'Indol	100
b) Séro-réaction	103

CINQUIÈME PARTIE

Analyses d'eau	109
----------------------	-----

SIXIÈME PARTIE

Conclusion	118
Index bibliographique	121
Table des matières	137

